

ESSAI DU TRIMÉTHYLAMINE N-OXYDE ET DU SODIUM 4-PHÉNYLBUTYRATE, CHAPERONNES À POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE, DANS L'ÉPIDERMOLYSE BULLEUSE SIMPLEX CAUSÉE PAR UNE MUTATION DANS LA KÉRATINE 14

Mémoire

JACYNTHE LACROIX

**Maîtrise en médecine expérimentale de l'Université Laval
offert en extension à l'Université du Québec à Chicoutimi**

Maître ès sciences (M.Sc.)

Sciences de la santé
Université du Québec à Chicoutimi
Chicoutimi, Canada

Faculté de médecine
Université Laval
Québec, Canada

© Jacynthe Lacroix, 2014

RESUME

L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) est une maladie orpheline dermatologique qui a une prévalence mondiale de 1/50 000 à 1/30 000. Elle est caractérisée par des mutations transmises de manière autosomale dominante dans les gènes de la kératine 5 (*KRT5*) et 14 (*KRT14*), menant à une agrégation des filaments intermédiaires. Phénotypiquement, il y a présence d'ampoules causées par un décollement de l'épiderme. Jusqu'à présent, aucune thérapie efficace n'est disponible.

Dans cette étude, des essais cellulaires évaluant le potentiel thérapeutique de deux chaperonnes chimiques, le triméthylamine N-oxyde (TMAO) et le sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA), ont été réalisés. Pour ce faire, trois lignées immortalisées de kératinocytes de patients EBS ayant une mutation dans *KRT14* et une lignée contrôle ont été utilisées pour déterminer la capacité des molécules à réduire le nombre de cellules ayant des agrégats. Les résultats ont montré un effet bénéfique significatif du TMAO seulement, et ce dans deux lignées uniquement. Ainsi, le TMAO se qualifie comme une approche thérapeutique potentielle.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des abbréviations	xiii
Remerciements	xv
Avant-propos.....	xvii
CHAPITRE 1	1
PEAU ET ÉPIDERMOLYSES	1
1.1 La peau	1
1.2 Les épidermolyses bulleuses.....	3
1.3 L'épidermolyse bulleuse simplex	5
1.3.1 L'épidermolyse bulleuse simplex localisée (OMIM 131 800).....	6
1.3.2 L'épidermolyse bulleuse simplex généralisée (OMIM 131 900).....	7
1.3.3 L'épidermolyse bulleuse simplex Dowling-Meara (OMIM 131 760) ...	7
1.3.4 L'épidermolyse bulleuse simplex à pigmentation mouchetée (OMIM 131 960).....	8
1.4 Les kératines	8
1.5 Mutations répertoriées dans les gènes de la kératine 5 et de la kératine 14 12	
1.6 Traitements pour l'épidermolyse bulleuse simplex	15
1.6.1. Thérapie génique et autres approches moléculaires	15
1.6.2 Utilisation de greffons.....	22
1.6.3 Agents pharmaceutiques	22
1.6.4 Criblage à haut débit	24

CHAPITRE 2	29
CHAPERONNES	29
2.1 Chaperonnes moléculaires	29
2.2 Chaperonnes chimiques	31
2.2.1 Triméthylamine N-Oxyde (TMAO)	32
2.2.2 Sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA)	36
2.3 Hypothèses et objectifs	39
Chapitre 3	41
Evaluation of the impact of two chaperones (TMAO and 4-PBA) on keratin aggregates in keratinocytes isolated from <i>KRT14</i> Epidermolysis Bullosa Simplex individuals	41
Résumé	41
Evaluation of the impact of two chaperones (TMAO and 4-PBA) on keratin aggregates in keratinocytes isolated from <i>KRT14</i> Epidermolysis Bullosa Simplex individuals	43
Abstract	44
Introduction	45
Materials and methods	46
<i>Immortalized keratinocytes establishment</i>	46
<i>Keratinocyte lines heat-shock and pre-treatment with different compounds</i>	48
<i>Immunofluorescence</i>	48
<i>Evaluation of the cytotoxicity</i>	49
<i>qRT-PCR</i>	49
<i>Preparation of cell lysates for Western Blot</i>	50
<i>Western blot</i>	50
Results	51
<i>Chemical molecules reduced heat-induced keratin aggregates (Fig 15 and Fig 16)</i>	51

<i>KRT16 and KRT17 expression after pre-treatment (Table 2)</i>	55
<i>Hsc70 production after pre-treatment (Table 2)</i>	55
Discussion	56
Acknowledgements	59
References	60
Chapitre 4	63
Discussion.....	63
4.1 Immunofluorescence	63
4.2 Nécrose	65
4.3 Évaluation de la kératine 16 et de la kératine 17	65
4.4 Évaluation de la protéine de choc thermique Hsc70	66
4.5 Perspectives	67
Conclusion	74
Bibliographie	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Phenotypes and mutations found in three EBS cases.....	47
Tableau 2: TMAO doesn't modify <i>KRT16</i> and <i>KRT17</i> expression or production of Hsc70.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différentes structures de la peau	1
Figure 2: Les différentes couches de l'épiderme	2
Figure 3: Représentation et localisation des diverses épidermolyses bulleuses	4
Figure 4: Le décollement de l'épiderme	6
Figure 5: Structure des kératines et assemblage des filaments intermédiaires	10
Figure 6: Les agrégats de kératine.....	11
Figure 7: Distribution des mutations de la kératine 5 et de la kératine 14	14
Figure 8: Thérapie génique	16
Figure 9: Mode d'action des ZFN et des TALEN	18
Figure 10: Technologie SMaRT (<i>Spliceosome-mediated RNA trans-splicing</i>) .	20
Figure 11: Production et mode d'action des petits ARN interférents (siRNA) ..	21
Figure 12: Le cycle d'Hsp70.....	31
Figure 13: Structure du triméthylamine N-oxyde	34
Figure 14: Structure du sodium 4-phénylbutyrate	37
Figure 15: TMAO reduces keratin aggregates in EBS derived keratinocytes...	53
Figure 16: 4-PBA doesn't reduce keratin aggregates in EBS derived keratinocytes	54

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

α 1-AT: α 1-antitrypsine

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP: Adénosine diphosphate

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: Adénosine triphosphate

BSA: *Bovine serum albumin*

CCT: *Chaperonin containing TCP-1*

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid*

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Diméthylsulfoxyde

EBS: Épidermolyse bulleuse simplex

EBS-DM: Épidermolyse bulleuse simplex Dowling-Meara

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GRP-X: *Glucose-regulated protein X*

HPV16: *Human papillomavirus 16*

HRD: *Homology directed repair*

Hsc70: *Heat shock cognate 70*

Hsp-X: *Heat shock protein X*

IF: *Intermediate filament*

K-X: *Kératine X*

KRT-X: *Gène de kératine X*

LDH: *Lactate dehydrogenase*

MAPK: *p38-mitogen-activated protein kinase*

NEF: *Nucleotide exchange factor*

NHEJ: *Non homologous end joining*

Pael-R: *Parkin-associated endothelin receptor-like factor*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SERT: *Serotonin transporter*

siRNA: *Small interfering RNA*

SMaRT: *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*

4-PBA: *Sodium 4-phénylbutyrate*

TALE: *Transcription Activator-Like Effector*

TALEN: *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

TBST: *Tris-buffered saline and Tween 20*

TMAO: *Triméthylamine N-oxyde*

TRiC: *TCP-1 ring complex*

TUDCA: *Tauroursodeoxycholic acid*

ZFN: *Zinc finger nucleases*

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement ma famille pour leur amour et leur support tout au long de cette aventure. Merci à mes parents, qui m'ont toujours encouragée dans mes études et dans ma vie et qui n'hésitent pas à me rappeler qu'il existe toujours un côté positif à ce qui arrive. À mes deux sœurs, Audrey et Sophie, qui étaient là pour m'écouter et me faire prendre conscience qu'il existe autre chose que le travail dans la vie. Aussi, un merci spécial à mes grands-parents, qui ont toujours cru en moi et qui ont pris la peine de s'intéresser à ce que je faisais.

Je voudrais aussi remercier ma directrice de maîtrise, Dre Catherine Laprise, de m'avoir donné une chance et de m'avoir permis de travailler sur un projet aussi stimulant. Elle a été un modèle professionnel pour moi grâce à sa rigueur, sa passion et sa volonté d'innover. Son soutien et son encadrement m'auront permis de mener à terme le projet d'obtenir une maîtrise.

Je tiens aussi à offrir mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire Gepromic, qui m'a accueillie chaleureusement. Je voudrais remercier Anne-Marie Madore et Vanessa Tremblay-Vaillancourt qui ont toujours été là pour répondre à mes questions, même les plus farfelues. Merci à vous tous pour tous les beaux moments en votre compagnie.

Finalement, je veux dédier ce mémoire à deux personnes qui me sont très précieuses; mes parents. Merci pour tout.

AVANT-PROPOS

Le mémoire qui suit est formé de trois sections principales. La première, composée des chapitres 1 et 2, fait état des connaissances actuelles au sujet de l'épidermolyse bulleuse simplexe, des kératines et de leur rôle, des essais thérapeutiques effectués précédemment, des chaperonnes moléculaires ainsi que des chaperonnes chimiques, dont font partie le triméthylamine N-oxyde (TMAO) et le sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA). La seconde partie concerne l'article scientifique qui traite des essais réalisés afin de déterminer le potentiel thérapeutique des deux molécules à l'étude. La troisième et dernière partie est constituée d'éléments généraux de discussion et de la conclusion de ce mémoire.

J'ai effectué les essais de réplique en immunofluorescence, les évaluations de toxicité, les mesures de l'expression de kératine par qRT-PCR ainsi que la quantification d'Hsc70 par Western Blot. De plus, j'ai contribué à la rédaction du manuscrit. Mbarka Bchetnia, stagiaire post-doctorale, a établi les lignées de kératinocytes immortalisées pour le contrôle et les trois patients atteints d'épidermolyse bulleuse simplexe (EBS), a effectué les courbes dose-réponse en immunofluorescence et a contribué à la rédaction du manuscrit. Tarik Farez a effectué les doubles des comptes de cellules en immunofluorescence pour les essais de réplique. Les patients à l'étude ont été recrutés par les docteurs Georgette Leclerc, Julie Powell, Catherine McCuaig et Audrey Dupéré. L'évaluation clinique des patients recrutés a été effectuée par le pédiatre Charles Morin. Tous les auteurs de l'article ont contribué à la révision du manuscrit. La responsable de cette étude est Catherine Laprise et elle a conçu le profil méthodologique de l'étude et supervisé toutes les étapes nécessaires à la réalisation de ce mémoire et de l'article.

CHAPITRE 1

PEAU ET ÉPIDERMOLYSES

1.1 La peau

Chez l'être humain, la peau constitue la première barrière contre les attaques de l'environnement. Plus grand organe du corps, elle est composée de 4 structures principales : l'hypoderme, le derme, la jonction épidermo-dermique et l'épiderme (figure 1) (Blacksin *et al.* 2006 ; Prost-Squarcioni 2006). L'hypoderme est constitué principalement de cellules graisseuses, est impliqué dans l'isolation et le contrôle de la température et sert de réserve d'énergie (Kanitakis 2002 ; Prost-Squarcioni 2006). Le derme est un tissu conjonctif constitué principalement de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire contenant entre autres du collagène (Lee 2000 ; Prost-Squarcioni 2006). Le rôle de cette couche est d'assurer une protection à l'épiderme ainsi que contre les traumatismes pouvant survenir (Lee 2000 ; Kanitakis 2002). La jonction dermo-épidermique est constituée de composants provenant à la fois du derme et de l'épiderme (Marionnet *et al.* 2006). Des interactions entre les kératinocytes et les fibroblastes permettent la synthèse de plusieurs protéines formant la membrane basale située entre l'épiderme et le derme (Marionnet *et al.* 2006).

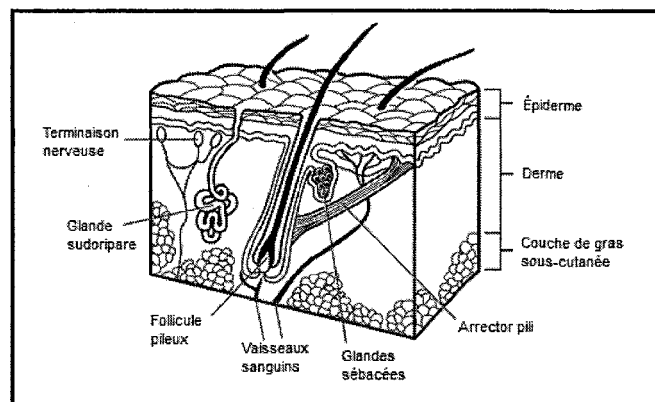


Figure 1: Les différentes structures de la peau

De bas en haut, on retrouve l'hypoderme, le derme, la jonction dermo-épidermique et l'épiderme. Modifiée de (Blacksin *et al.* 2006).

Au sein de l'épiderme, on retrouve plusieurs couches de kératinocytes à des stades divers de différenciation. À la jonction entre le derme et l'épiderme se retrouve la stratum basale (couche basale) contenant les kératinocytes basaux, qui ne sont pas différenciés et qui ont un taux de croissance plus élevé (Aumailley *et al.* 2006). Au-dessus se retrouvent la stratum spinosum, la stratum granulosum (couche granulaire) ainsi que la stratum corneum (couche cornée), qui est en contact direct avec l'environnement (figure 2) (Kanitakis 2002 ; Brogden *et al.* 2012). La couche supérieure de l'épiderme est constituée de cellules cornées qui ont terminé leur différenciation (Aumailley *et al.* 2006).

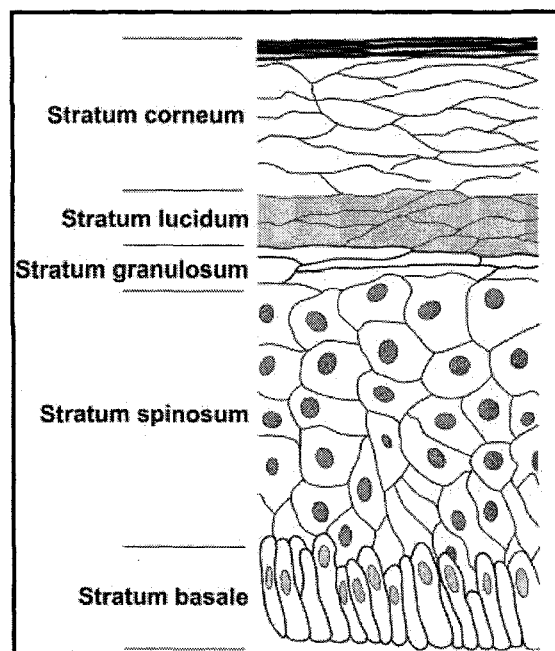


Figure 2: Les différentes couches de l'épiderme

De bas en haut, on retrouve la stratum basale (couche basale), la stratum spinosum, la stratum granulosum (couche granulaire), la stratum lucidum ainsi que la stratum corneum (couche cornée). Modifiée de (Brogden *et al.* 2012).

Différents types cellulaires constituent l'épiderme soit : les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les kératinocytes (Prost-Squarcioni 2006). Les mélanocytes sont les cellules responsables de la production de mélanine, un pigment impliqué dans la coloration de la peau (Halaban *et al.* 1983). Les cellules de Langerhans sont des cellules immunes

responsables de la reconnaissance et de la présentation des antigènes déposés sur la peau aux lymphocytes T naïfs (Girolomoni *et al.* 2002). Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs, présentant à la fois des caractéristiques épithéliales et neuroendocrines (Tachibana 1995). Le type cellulaire majoritaire de l'épiderme est les kératinocytes, qui sont retrouvés dans une proportion variant entre 80 et 95% (Kanitakis 2002 ; Prost-Squarcioni 2006). Le maintien de la structure de la peau et la protection contre l'environnement ainsi que contre les radiations lumineuses sont des fonctions assurées par les kératinocytes (Prost-Squarcioni 2006). Les kératinocytes de chaque couche de l'épiderme présentent des différences morphologiques et fonctionnelles. Les cornéocytes, les kératinocytes de la couche cornée, ont une forme hexagonale, sont dépourvus de noyau et d'organelles et sont impliqués dans la fonction de barrière (Elias 1983 ; Simon *et al.* 2001). Les kératinocytes de la couche granulaire sont plats et contiennent des organelles impliqués dans la desquamation de la peau (Kanitakis 2002). Les cellules composant la stratum spinosum contiennent des groupes de tonofilaments et ont une morphologie polygonale (Eichner *et al.* 1986). Les kératinocytes de la couche basale sont cubiques et contiennent des filaments intermédiaires, une structure impliquée dans le cytosquelette qui permet l'attachement des cellules à la jonction dermo-épidermique (Kanitakis 2002). Ce sont également les cellules de cette couche qui sont responsables de la régénération de l'épiderme (Roberts et Brunt 1986).

1.2 Les épidermolyses bulleuses

Parmi les maladies génétiques affectant la peau, on retrouve les épidermolyses bulleuses. Ces maladies sont caractérisées par la présence de cloques qui font en sorte que l'intégrité de la peau est compromise. Le terme épidermolyse bulleuse fait référence au détachement de l'épiderme du derme induit mécaniquement. Ces désordres ont également été observés chez plusieurs animaux, entre autres les chiens, les chevaux, les vaches et les moutons (Bruckner-Tuderman 1994). Les épidermolyses bulleuses sont classifiées en trois types selon l'endroit où se produit le clivage, comme l'illustre

la figure 3 : l'épidermolyse bulleuse dystrophique (clivage au niveau intradermal), l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (clivage au niveau de la jonction dermo-épidermique, de la lamina lucida) et l'épidermolyse bulleuse simplex (clivage au niveau de l'épiderme, des kératinocytes basaux) (Mitsuhashi et Hashimoto 2003 ; Sawamura *et al.* 2010). Il existe également un quatrième type d'épidermolyse bulleuse, le syndrome de Kindler, pour lequel on retrouve des ampoules à plus d'un niveau (Intong et Murrell 2012). Les épidermolyses bulleuses sont classées selon l'endroit des lésions, le mode de transmission et les caractéristiques cliniques (Mitsuhashi et Hashimoto 2003). En 2003, plus de 1000 mutations situées sur au moins 14 gènes de structure avaient été recensées pour l'ensemble des types d'épidermolyse bulleuse (Intong et Murrell 2012).

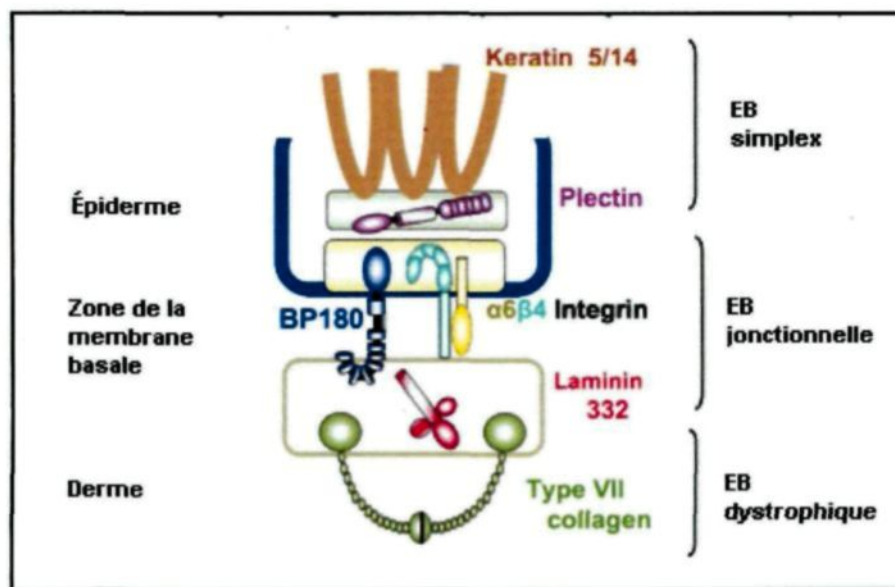


Figure 3: Représentation et localisation des diverses épidermolyses bulleuses

L'épidermolyse bulleuse dystrophique survient au niveau du derme, l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle à la jonction dermo-épidermique et l'épidermolyse bulleuse simplex au sein de l'épiderme. Modifiée de (Sawamura *et al.* 2010).

1.3 L'épidermolyse bulleuse simplex

L'épidermolyse bulleuse simplex a une prévalence à travers le monde de 1 sur 50 000 à 1 sur 30 000 (Tang *et al.* 2009). Elle est caractérisée par une perte de l'intégrité des tissus qui survient dans les kératinocytes de l'épiderme à la suite d'un stress mécanique léger (Coulombe *et al.* 2009). Vis-à-vis un stress physique, l'intégrité du tissu dépendra de deux éléments soit les complexes d'adhésion, qui relient les cellules entre elles et à la matrice extracellulaire, ainsi que les filaments intermédiaires situés au sein des cellules (Liovic *et al.* 2009). Plusieurs types de stress peuvent affaiblir les cellules des patients dont le stress osmotique (D'Alessandro *et al.* 2002). Au niveau morphologique, cela se traduit par la présence de bulles cutanées qui causent le décollement de l'épiderme chez les gens atteints (figure 4) (Chan *et al.* 1994). Le mode de transmission de l'EBS est majoritairement autosomique dominant (Gu et Coulombe 2007). L'EBS peut être sans gravité comme il peut être sévère (Rugg *et al.* 2007). Bien que les nouveaux-nés puissent souffrir d'infections de la peau récurrentes et de déficits nutritionnels causés par la présence de cloques généralisées, la situation s'améliore avec l'âge. Il n'y a pas de retard de croissance ou d'anémie chez les enfants plus âgés (Paller 2004). Les mutations présentes et leurs effets sur l'ARNm et les kératines déterminent le degré de fragilité de la peau (Tamai *et al.* 2009).

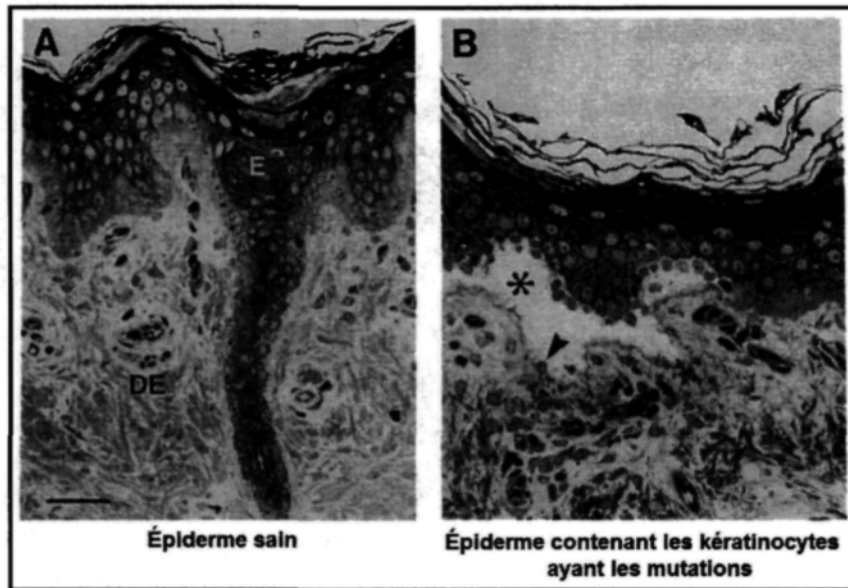


Figure 4: Le décollement de l'épiderme

a) Dans une zone de la peau non atteinte, le derme et l'épiderme sont liés. b) Dans une zone de la peau atteinte, la présence de bulles cutanées (identifiée par un astérisque) cause le décollement de l'épiderme. Modifiée de (Chan *et al.* 1994).

Selon une classification récente, il existe quatre types d'épidermolyses bulleuses simplex ; la localisée (anciennement connue sous le nom de Weber-Cockayne), la généralisée (anciennement connue sous le nom de Kobner), la Dowling-Meara (herpétiforme) et l'épidermolyse bulleuse à pigmentation mouchetée (Fine *et al.* 2008).

1.3.1 L'épidermolyse bulleuse simplex localisée (OMIM 131 800)

L'épidermolyse bulleuse localisée a été découverte en 1926 par Weber puis confirmée en 1938 par Cockayne (Weber 1926 ; Cockayne 1938) et est caractérisée par des cloques limitées aux mains et aux pieds et parfois aux zones où les traumatismes sont répétés. Elle peut se développer durant la petite enfance ou à l'âge adulte. Les gens atteints souffrent davantage durant les mois plus chauds et ce type d'épidermolyse est fréquemment associé avec

la kératodermie palmoplantaire (Coulombe et Lee 2012). Il s'agit du type le plus commun, qui affecte une personne sur 17 000 (Moss *et al.* 2009).

1.3.2 L'épidermolyse bulleuse simplex généralisée (OMIM 131 900)

L'épidermolyse bulleuse généralisée a été découverte en 1886 par Koebner (Koebner 1886) et est caractérisée par des cloques qui se situent surtout au niveau des mains et des pieds, mais qui se retrouvent également sur le reste du corps. Une analyse par microscopie électronique des kératinocytes provenant de personnes atteintes de la maladie démontre l'absence de larges tonofilaments, soit des filaments intermédiaires de kératine. Cette pathologie se développe dès la naissance ou durant l'enfance et, comme l'épidermolyse localisée, les personnes atteintes souffrent plus durant les mois plus chauds (Coulombe et Lee 2012). La prévalence de ce sous-type est estimée à 1/35 000 (Orphanet 2013).

1.3.3 L'épidermolyse bulleuse simplex Dowling-Meara (OMIM 131 760)

L'épidermolyse bulleuse Dowling-Meara (herpétiforme) a été découverte en 1954 (Dowling et Meara 1954) et est caractérisée par des cloques sévères et étendues sur tout le corps. Ce sous-type est le plus sévère et peut entraîner la mort dans certains cas (Fine *et al.* 1991). Les cloques sont herpétiformes et hémorragiques et sont observées dès la naissance. Il est également possible d'observer une implication des muqueuses, des ongles dystrophiques, une kératodermie palmoplantaire progressive et parfois une hypo- ou une hyperpigmentation. Contrairement aux deux types d'épidermolyses bulleuses simplex précédemment mentionnés, il est possible que l'état des patients s'améliore avec la fièvre ou la chaleur (Coulombe et Lee 2012). Une des caractéristiques cellulaires de ce type permettant de le distinguer est l'agrégation des tonofilaments au sein des kératinocytes (Bergman 1999). La prévalence mondiale de ce sous-type n'est pas connue, mais elle est estimée à 1 personne sur 1 700 000 en Écosse (Orphanet 2013).

1.3.4 L'épidermolyse bulleuse simplex à pigmentation mouchetée (OMIM 131 960)

L'épidermolyse bulleuse à pigmentation mouchetée a été découverte en 1979 (Fischer et Gedde-Dahl 1979) et est caractérisée par des cloques accompagnées d'une pigmentation mouchetée du tronc et des membres. Les ampoules apparaissent d'abord à la naissance ou au cours de l'enfance. Une diminution est observée avec l'âge et elles sont peu présentes chez les adultes. Les lésions hyperpigmentées, l'autre caractéristique majeure, font leur apparition plus tard et diminuent également sans disparaître complètement (Echeverria-Garcia *et al.* 2012). Ce type d'épidermolyse bulleuse simplex implique également une kératodermie palmoplantaire ponctuée et une dystrophie des ongles. Il se développe dès la naissance ou au cours de l'enfance (Coulombe et Lee 2012). Il s'agit d'un sous-type peu commun d'épidermolyse bulleuse simplex dont les caractéristiques dépendent de l'âge lors du diagnostic (Echeverria-Garcia *et al.* 2012). La prévalence à travers le monde de ce sous-type est indéterminée. Cependant, environ 30 familles ont été rapportées jusqu'à présent (Orphanet 2013).

1.4 Les kératines

Chez l'homme, on recense 54 gènes fonctionnels de kératine ainsi que des centaines de pseudogènes (McLean et Moore 2011). On retrouve deux familles de kératines, celles de type I et celles de type II. Elles sont constituées de plusieurs domaines, soit la tête, le domaine central composé de 4 sous domaines (1A, 1B, 2A, 2B), la queue et de plusieurs *linkers*, soit L1 (entre 1A et 1B), L12 (entre 1B et 2A) et L2 (entre 2A et 2B) (figure 5) (Yasukawa *et al.* 2006 ; Alberts *et al.* 2010 ; Chamcheu *et al.* 2011b). D'un côté, les kératines appartenant à la famille de type I sont codées par des gènes du chromosome 17, ont un point isoélectrique acide et sont plus petites. D'un autre côté, les kératines appartenant à la famille de type II sont codées par des gènes du chromosome 12, ont un point isoélectrique basique et sont plus grosses (Cao *et al.* 2001). La famille I regroupe 28 gènes de kératine (K9-K20) tandis que la

famille II regroupe 26 gènes de kératine (K1-K8) (Moll *et al.* 2008). K5 et K14 sont principalement exprimées dans les kératinocytes basaux indifférenciés de l'épiderme tandis que les kératines de différenciation K1 et K10 sont exprimées dans les couches supérieures (Uitto et Richard 2005). Les kératines ont plusieurs rôles dans la cellule: support structural, cytoarchitecture, implication dans la réponse au stress, régulation des voies de signalisation vers l'apoptose, synthèse des protéines et distribution des organites et des vésicules (Arin 2009).

Généralement, un membre de la famille des kératines de type I forme une association avec un membre de la famille des kératines de type II (Hatzfeld et Franke 1985). Ainsi, K5 et K14 sont des partenaires et s'assemblent pour former des hétérodimères. C'est par le biais du domaine central que se produisent la dimérisation et la polymérisation d'ordre plus élevé (Irvine et Mclean 1999). Pour une reconnaissance efficace qui mènera à l'assemblage *in vivo*, au moins les deux tiers soit de l'hélice 1B soit de l'hélice 2B de K5 doivent être présents pour K14. Par la suite, 10 000-20 000 hétérodimères de kératine s'assemblent dans une hiérarchie d'associations latérales et bout-à-bout pour former un filament simple de 10 nm, que l'on nomme filament intermédiaire (Chan *et al.* 1994).

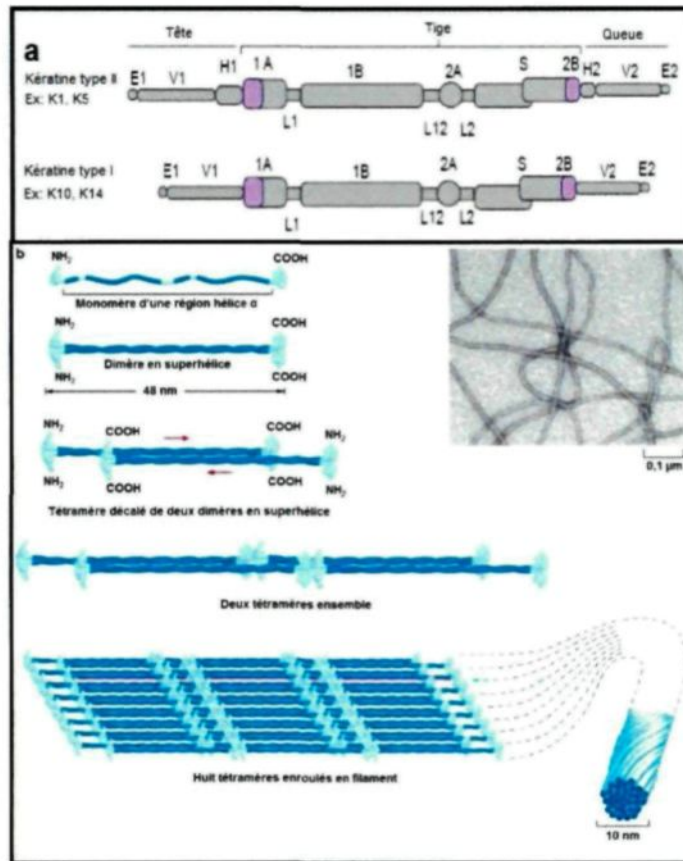


Figure 5: Structure des kératines et assemblage des filaments intermédiaires

a) Représentation des domaines des kératines de type I et de type II b) Assemblage des kératines en filaments intermédiaires. Modifiée de (Chamcheu *et al.* 2011b (a) et Alberts *et al.* 2010 (b)).

Un choc thermique provoque la formation rapide d'agrégats de kératine chez les gens atteints d'EBS tandis que les kératinocytes normaux ne sont pas sujets à une telle altération (Chamcheu *et al.* 2010). Dans les faits, les agrégats de kératine représentent un amas de protéines incorrectement assemblées qui devraient être dégradées par le protéasome (figure 6). Le nombre d'agrégats est en corrélation avec le phénotype d'EBS, c'est-à-dire qu'il y en a plus dans les cellules de patients atteints d'une forme sévère (Chamcheu *et al.* 2011a). Les agrégats de kératines ne sont pas des structures statiques, ce sont en fait des assemblages transitoires et dynamiques. Ces derniers se forment près de

la membrane plasmique et se déplacent ensuite vers le centre de la cellule, où ils se désassemblent (Werner *et al.* 2004).

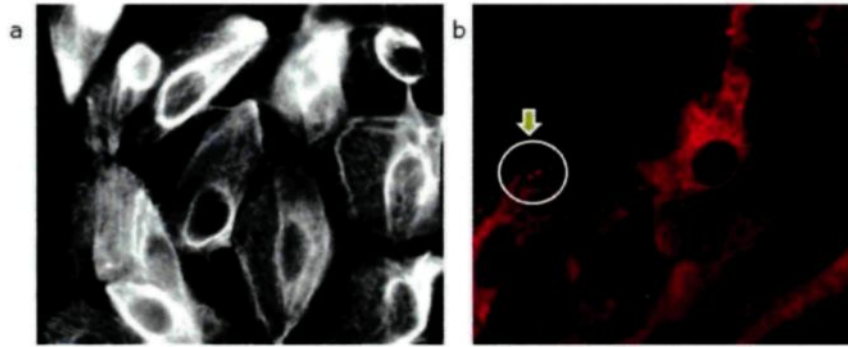


Figure 6: Les agrégats de kératine

a) Des kératinocytes provenant d'une personne saine et ayant un réseau de filaments de kératines intact. b) Des kératinocytes provenant d'un patient atteint d'EBS dans lesquels il est possible d'observer des agrégats de kératines incorrectement assemblées (flèche) (Photo du laboratoire dirigé par Catherine Laprise, 2012).

Au fil des ans, plusieurs théories ont été proposées afin de trouver une explication à la fragilité mécanique des kératinocytes des patients atteints d'épidermolyse bulleuse simple. La première est appelée «filaments fragiles» et stipule que les filaments assemblés à partir des kératines contenant une mutation ont un défaut mécanique (Russell *et al.* 2004 ; Werner *et al.* 2004). La seconde est connue sous le nom «réseaux fragiles» et prétend que les défauts mécaniques du réseau de kératine proviennent d'interactions inappropriées des filaments (Ma *et al.* 2001). La dernière théorie est celle du «réseau épars» qui postule que la densité du réseau de kératine est plus faible chez les patients, ce qui diminue leur résistance vis-à-vis d'un stress (Peters *et al.* 2001).

Dans le cas de l'épidermolyse bulleuse simplex localisée, *KRT5* est touchée plus fréquemment, mais parfois les mutations sont situées dans *KRT14* (Yasukawa *et al.* 2006 ; Coulombe et Lee 2012). Dans le cas de l'épidermolyse bulleuse généralisée, les mutations se retrouvent surtout dans le domaine C-terminal et le domaine L2 de la K5 et dans la K14 (Yasukawa *et al.* 2006 ; Coulombe et Lee 2012). Pour ce qui est de la forme Dowling-Meara, les mutations sont observées dans K5 et dans les régions N- et C-terminales du domaine central de K14 (Yasukawa *et al.* 2006 ; Coulombe et Lee 2012). En ce qui concerne l'épidermolyse bulleuse simplex à pigmentation mouchetée, des mutations dans le domaine de la tête de K5 et dans K14 ont été recensées (Coulombe et Lee 2012). La mutation la plus commune pour l'EBS à pigmentation mouchetée est située dans le gène de la kératine 5 et cause un changement d'une proline par une leucine au niveau protéique (Fine *et al.* 2008). L'ensemble des mutations recensées jusqu'en septembre 2011, l'endroit où elles se situent sur les gènes de kératine 5 et 14 ainsi que le type d'EBS associé sont représentés à la figure 7.

1.6 Traitements pour l'épidermolyse bulleuse simplex

Jusqu'à maintenant aucune thérapie efficace n'est disponible pour traiter l'épidermolyse bulleuse simplex. Il est plutôt question de pansements et de moyens palliatifs visant à diminuer la souffrance des personnes atteintes sans pour autant guérir la maladie. Trouver un traitement pour ce trouble représente un défi particulier relié aux caractéristiques de la maladie : le mode de transmission majoritairement dominant des mutations de la kératine, le large spectre de mutations qui affectent l'un ou l'autre des gènes de la kératine 5 et de la kératine 14 ainsi que le taux de renouvellement élevé des cellules qui est observé dans l'épiderme (Coulombe *et al.* 2009).

1.6.1. Thérapie génique et autres approches moléculaires

À ce jour, plusieurs modèles de thérapie ont été élaborés dont la thérapie génique au niveau de l'ADN qui consisterait à faire pénétrer dans la cellule à l'aide d'un vecteur une copie normale du gène de la kératine mutée (figure 8) (Strachan et Read 1999 ; Ferrari *et al.* 2006 ; Bergoglio *et al.* 2008). Puisque l'épidermolyse est une maladie affectant la peau, le transport du gène au sein des cellules à traiter est facilité, les effets peuvent être observés et mesurés rapidement et, dans le cas de problèmes, la zone traitée peut être retirée (Uitto 2008). Cependant puisque la maladie a un mode de transmission principalement dominant, délivrer le gène sauvage est difficilement envisageable (Gu et Coulombe 2007).

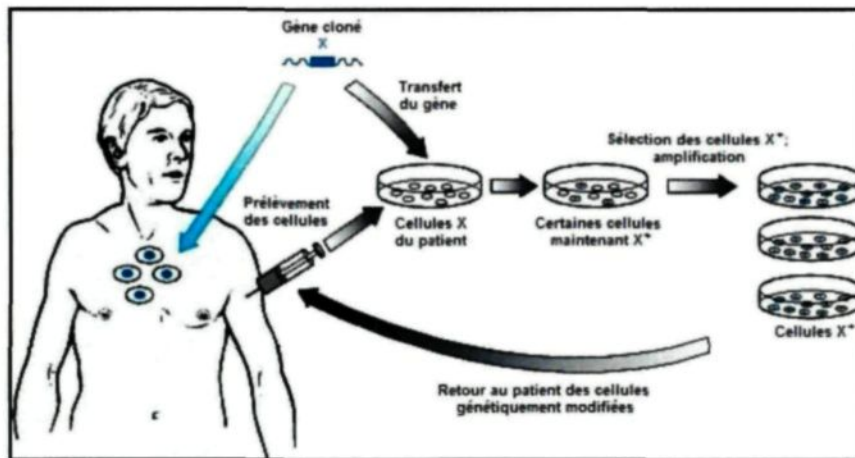


Figure 8: Thérapie génique

Pour effectuer une thérapie génique *ex vivo*, il faut prélever une biopsie de peau saine et effectuer la culture des cellules concernées. L'étape suivante consiste en l'introduction du gène thérapeutique (X). Par la suite, il faut effectuer la culture des cellules contenant ce gène (X⁺). L'étape ultime consiste à greffer chez le patient les cellules contenant le gène corrigé (X⁺). La flèche bleue représente la thérapie génique *in vivo*, où le gène est transféré directement chez le patient. Modifiée de (Strachan et Read 1999).

Une autre possibilité pour effectuer une thérapie génique fait appel aux nucléases *zinc finger* (ZFN), lesquelles sont des protéines comprenant des domaines *zinc finger* et le domaine de clivage de l'endonuclease Fok I (Miller *et al.* 1985 ; Choo et Klug 1994 ; Rebar et Pabo 1994 ; Pabo *et al.* 2001 ; Tan *et al.* 2003) (Figure 9). Les *zinc finger* sont responsables de la reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique et le domaine de Fok I est responsable du clivage de cette séquence (Miller *et al.* 1985 ; Kim *et al.* 1996 ; Bibikova *et al.* 2001 ; Bibikova *et al.* 2002 ; Bibikova *et al.* 2003). Il est possible de modifier les *zinc finger* afin que ceux-ci soient capables de reconnaître potentiellement toute séquence d'ADN désirée dans le génome (Collin et Lako 2011). Chaque *zinc finger* est capable de reconnaître un motif de trois paires de base (Pabo *et al.* 2001 ; Bae *et al.* 2003). Il est possible de créer des nucléases contenant jusqu'à six «doigts» pour la reconnaissance d'une séquence de 18 paires de

base (Miller *et al.* 2007 ; Perez *et al.* 2008 ; Hockemeyer *et al.* 2009). Les nucléases *zinc finger* fonctionnent en dimères, ce qui signifie que deux d'entre elles doivent se fixer en une orientation opposée sur la séquence désirée pour que Fok I puisse procéder au clivage (Vanamee *et al.* 2001 ; Collin et Lako 2011). Donc, il est possible de créer une nucléase qui reconnaîtra la séquence désirée et qui la clivera au centre du dimère (Urnov *et al.* 2005).

Il existe également un autre type de molécules ayant une activité de clivage, les *Transcription Activator-Like Effector (TALE) Nucleases (TALEN)* (figure 9). Celles-ci sont composées du domaine de clivage de l'endonucléase Fok I et de un ou plusieurs TALE (Sung *et al.* 2012). Les TALE sont des facteurs de transcription issus d'un pathogène bactérien et ont le même rôle que les *zinc finger*, c'est-à-dire la reconnaissance d'une séquence spécifique d'ADN (Kay *et al.* 2007 ; Boch *et al.* 2009). Contrairement au *zinc finger*, chaque TALE reconnaît une paire de base (Boch *et al.* 2009). Cependant, le code permettant de déterminer quel nucléotide sera reconnu est simple et a été décrit par Boch et son équipe (Boch *et al.* 2009). Tout comme les nucléases *zinc finger*, les TALE fonctionnent en dimères et le clivage sera fait au milieu de cet assemblage (Bitinaite *et al.* 1998).

Le mode de fonctionnement de ces molécules fait appel aux voies de réparation de l'ADN propres à la cellule (Jackson et Bartek 2009). Deux voies sont concernées; la voie des extrémités d'assemblage non homologues (de l'anglais *non homologous end joining* (NHEJ)) et la voie de réparation directe homologue (pour *homology directed repair* (HRD)) (Lieber 2010 ; Moynahan et Jasin 2010). La voie NHEJ est utilisée par les organismes haploïdes ou diploïdes qui ne sont pas en phase S pour joindre deux bouts d'ADN non homologues à la suite d'un bris (Moore et Haber 1996). La voie HRD quant à elle, est utilisée par les organismes diploïdes et permet de réparer les bris en utilisant un ADN donneur homologue (Sung et Klein 2006 ; San Filippo *et al.* 2008). Les *zinc finger* peuvent être utilisés entre autres pour créer des *knockout*

d'un gène via l'induction de mutation par la voie NHEJ à la suite d'un bris double brin de l'ADN (Bibikova *et al.* 2002). Il est également possible de créer des *knockout* en utilisant la voie HRD et l'insertion d'une cassette de sélection (Collin et Lako 2011). Il est aussi envisageable d'utiliser les ZFN et la voie HRD pour effectuer une correction d'un gène muté en ajoutant une séquence d'ADN sans la mutation concernée (Moehle *et al.* 2007 ; Collin et Lako 2011). Par ailleurs, les *zinc finger* et la voie HRD peuvent également servir à étiqueter un gène via l'introduction d'une cassette contenant un gène de fluorescence (GFP par exemple) (Collin et Lako 2011). Les TALEN sont également utilisés comme outils de modification du génome et peuvent servir à générer des organismes génétiquement modifiés. Les TALEN ont déjà servi pour des modèles de *C. elegans*, de poisson zèbre, de rat, de vache et de cochon (Huang *et al.* 2011 ; Sander *et al.* 2011 ; Tesson *et al.* 2011 ; Wood *et al.* 2011 ; Carlson *et al.* 2012).

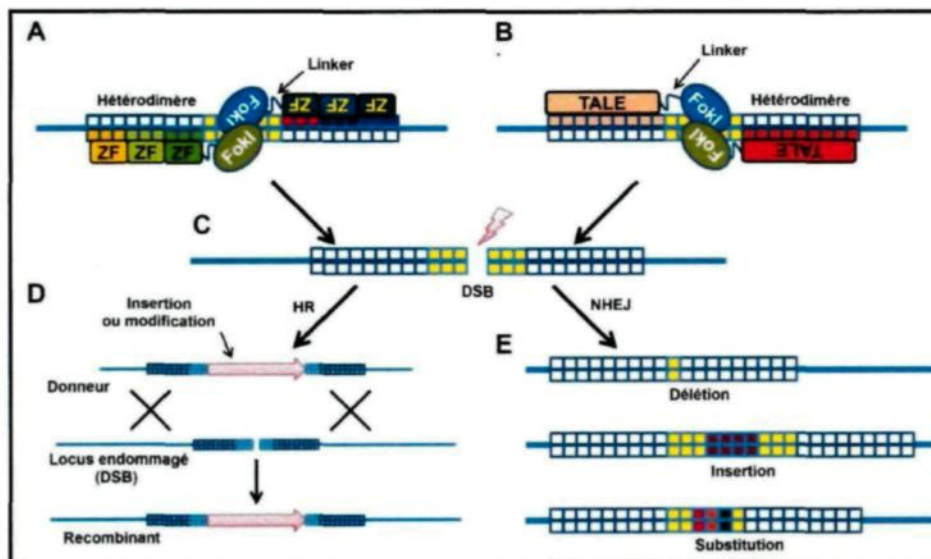


Figure 9: Mode d'action des ZFN et des TALEN

Représentation de la structure d'un *zinc finger nuclease* (ZFN) (A) et d'un *Transcription Activator-Like Effector* (TALE) *Nucleases* (TALEN) (B). Chaque paire de ZFN ou TALEN se lie à la séquence d'ADN désirée pour y introduire un bris double brin (DSB) (C). Ce bris pourra être réparé par la voie de réparation directe homologue (*homology directed repair* (HR)) (D) ou par la voie des extrémités d'assemblage non homologues (*non homologous end joining* (NHEJ)) (E). Modifiée de (Sung *et al.* 2012).

Parmi les avantages de l'utilisation de ces deux types de molécules de clivage, on retrouve la spécificité de la séquence reconnue (Boch *et al.* 2009 ; Collin et Lako 2011). En effet, il est possible de reconnaître théoriquement toute séquence désirée au sein d'un génome connu. Par exemple, une nucléase contenant six motifs *zinc finger*, pour un total de 18 paires de bases, serait suffisante pour se lier à n'importe quel endroit du génome murin (Kim et Pabo 1998). Un autre avantage de ces techniques est leur faible toxicité lorsqu'elles sont utilisées pour créer des modifications génétiques (Collin et Lako 2011). Cependant, il a été observé que pour une efficacité similaire, les TALEN étaient moins cytotoxiques que les ZFN (Mussolino *et al.* 2011). Deux désavantages de ces technologies sont à mentionner; la formation d'homodimères ainsi que la liaison et le clivage aux sites homologues (Cornu *et al.* 2008 ; Collin et Lako 2011). En temps normal, les ZFN et les TALEN fonctionnent en hétérodimères pour induire le clivage au site désiré (Sung *et al.* 2012). Cependant, la formation d'homodimères peut se produire et induire un clivage à un site autre que celui qui était désiré, ce qui risque d'entraîner de potentiels effets délétères (Cornu *et al.* 2008 ; Collin et Lako 2011). Pour contrer ce problème, l'équipe de Miller a modifié le domaine de clivage de Fok I pour favoriser la formation d'hétérodimères par rapport aux homodimères (Miller *et al.* 2007). Le clivage aux endroits homologues peut poser problème lorsque les ZFN sont utilisés pour insérer des mutations ou des bouts d'ADN donneur (Collin et Lako 2011). En effet, cela peut résulter en l'insertion de l'ADN donneur à un autre site que celui désiré et ainsi compromettre les conditions de l'expérimentation (Collin et Lako 2011). Pour pallier à cette situation, il est possible de séquencer une partie des clones produits, que ce soit aux sites les plus probables ou pour le génome en entier, pour détecter toute insertion inattendue afin de ne conserver que les clones désirés (Collin et Lako 2011).

Au niveau de l'ARN, on retrouve la technologie SMaRT (*Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*), dont l'objectif est de remplacer une partie de l'ARN muté, par exemple quelques exons, par de l'ARN messager normal (figure 10) (Dallinger *et al.* 2003 ; Yang et Walsh 2005 ; Wally *et al.* 2010).

Parmi les avantages de cette technique, on retrouve sa spécificité à la fois pour la séquence ciblée et pour les cellules qui exprimeront la construction (Liu *et al.* 2002 ; Hengge 2008). Cependant, le design d'une séquence optimale et l'efficacité relativement faible de la méthode représentent quelques-unes de ses limites (Hengge 2008).

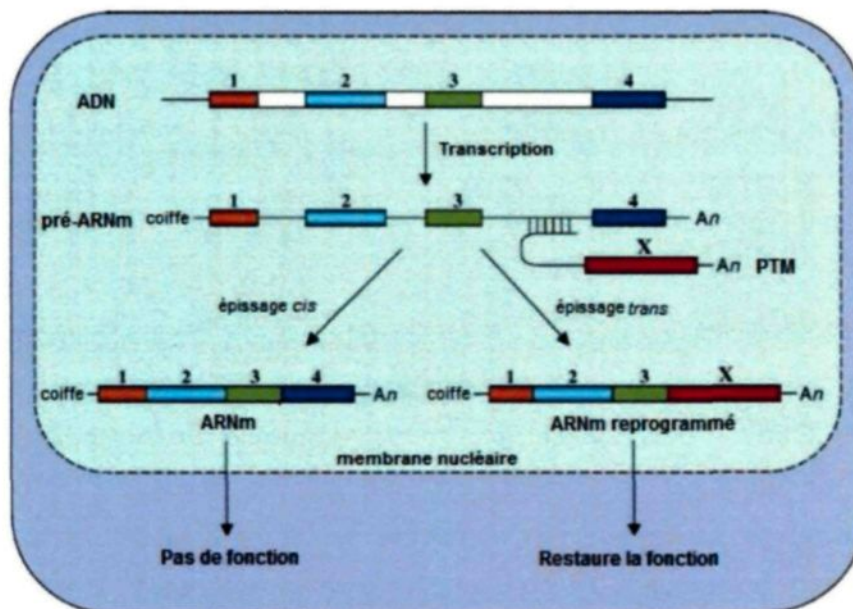


Figure 10: Technologie SMaRT (*Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*)

Dans le cas d'un épissage *cis*, le résultat sera un ARN contenant une mutation dans la kératine qui l'empêchera de s'assembler correctement. Dans le cas d'un épissage *trans*, une molécule de pré-épissage *trans* (PTM) contenant l'exon sans mutation vient se lier au pré-ARNm endogène, résultant en un ARNm sans mutation qui sera apte à accomplir sa fonction. Modifiée de (Yang et Walsh 2005).

Une autre méthode utilisant l'ARN est la transfection des cellules avec de petits ARN interférents (siRNA), de petites molécules double brin dont le rôle est d'inhiber de manière spécifique l'expression d'un gène cible (figure 11) (Atkinson *et al.* 2011 ; Hickerson *et al.* 2011 ; Gravrilov et Saltzman 2012). Par exemple, des cellules ont tout d'abord été transfectées avec soit une kératine 5

sauvage ou contenant une de deux mutations étudiées. Par la suite, ces mêmes cellules ont été transfectées avec un ARN interférent spécifique à la mutation. Cela a résulté en une diminution significative du nombre de cellules ayant des agrégats (Atkinson *et al.* 2011).

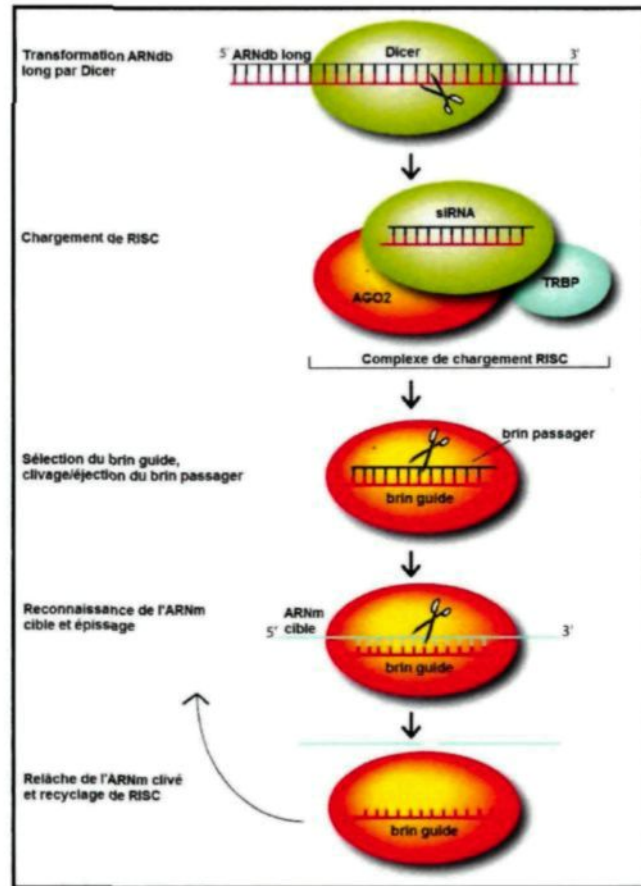


Figure 11: Production et mode d'action des petits ARN interférents (siRNA)

Au départ, les siRNA sont de longues molécules double brin qui sont coupées en fragments de quelques nucléotides par l'enzyme Dicer. Par la suite, à l'aide de la protéine TRBP, Dicer va charger le siRNA au sein du *RNA-induced silencing complex* (RISC), représenté ici par la protéine AGO2. A ce moment le complexe RISC reconnaît le brin guide, clive le brin passager et l'éjecte. Le complexe va ensuite reconnaître son ARNm cible et s'y fixer. L'étape suivante est le clivage de l'ARNm cible, ce qui empêche la traduction de ce dernier. La dernière étape est le relâchement de l'ARNm clivé et la récupération du complexe pour le clivage d'autres ARNm. Modifiée de (Gavrilov et Saltzman 2012).

1.6.2 Utilisation de greffons

Par ailleurs, on retrouve la greffe de peau fabriquée en laboratoire qui consiste à appliquer un pansement de peau synthétique sur une zone de la peau de personnes atteintes (Fivenson *et al.* 2003). La greffe de kératinocytes allogéniques chez un patient qui ne pouvait recevoir de greffe de sa propre peau a été effectuée (Shin *et al.* 2011). Des améliorations perceptibles des blessures qui n'étaient pas guéries et une diminution de la douleur ont été observées (Shin *et al.* 2011).

1.6.3 Agents pharmaceutiques

Plusieurs molécules ont également été évaluées afin de trouver un composé qui pourrait traiter l'épidermolyse bulleuse simplex. Certaines des molécules ont été évaluées parce qu'un effet avait été rapporté par les patients ou avait été rapporté dans une autre étude. En 1983, plusieurs patients ont rapporté un effet bénéfique de l'acide p-(n-butoxy)phénylacéthydroxamique (bufexamac), un agent anti-inflammatoire (Fine et Johnson 1988). Une étude clinique fut entreprise avec 9 individus EBS localisée et 1 individu EBS généralisée. La conclusion de ces travaux fut l'inefficacité de l'application topique d'une solution de 5% de l'acide p-(n-butoxy)phénylacéthydroxamique (Fine et Johnson 1988). Dans le cas de l'isotrétinoïne, un traitement prescrit pour l'acné, un effet avait été observé chez 3 patients atteints d'EB dystrophique récessive sévère (Andreano et Tomecki 1988). Le traitement a été tenté avec succès chez un patient EBS localisée (Andreano et Tomecki 1988). Une autre molécule étudiée dans le cadre de l'EBS est l'hydrochlorate de cyproheptadine, un antagoniste de la sérotonine (Neufeld-Kaiser et Sybert 1997). Des rapports de diminution de cloques chez des personnes EBS-DM ayant été traitées avec d'autres antagonistes du 5-hydroxytryptamine-2 ont poussé ces chercheurs à effectuer une étude de l'hydrochlorate de cyproheptadine chez 13 personnes atteintes d'EBS-DM (Neufeld-Kaiser et Sybert 1997). Parmi les patients ayant complété l'étude, seulement quatre ont observé une diminution des cloques (Neufeld-Kaiser et Sybert 1997). Parmi les composés ayant fait l'objet d'une étude, on retrouve également la toxine du

botulisme type A, mieux connue sous le nom commercial Botox (Abitbol et Zhou 2009). Une autre étude ayant rapporté des effets de cette toxine en ce qui a trait à la diminution de l'hyperhidrose a été l'inspiration de ces travaux (Abitbol et Zhou 2009). En effet, l'hypothèse de travail était qu'une sudation abondante pouvait mener à des frictions indésirables et donc à l'apparition de cloques chez un individu EBS (Abitbol et Zhou 2009). Des injections ont été effectuées chez un individu EBS localisée et les effets pouvaient durer entre 4 mois et un an (Abitbol et Zhou 2009).

Les effets thérapeutiques de certaines molécules dans le contexte d'EBS ont également été découverts par hasard. Ce fut d'abord le cas pour la pipamperone, un médicament tranquillisant utilisé d'abord pour traiter la schizophrénie (Bonnetblanc et Bouquier 1986). En effet, un patient EBS-DM avait reçu un traitement avec cette molécule pour soigner des troubles psychologiques sévères (Bonnetblanc et Bouquier 1986). Les médecins ont par la suite constaté une amélioration des cloques chez ce patient. Des expériences réalisées subséquemment ont démontré l'existence d'une relation entre la dose prescrite et le niveau d'amélioration des cloques (Bonnetblanc et Bouquier 1986). Un autre composé dont les effets ont été découverts aléatoirement est la tétracycline, un antibiotique (Malkinson 1999). Dans ce cas, la personne était atteinte d'EBS-DM et prenait cet antibiotique pour soigner son acné (Malkinson 1999). Cependant, elle a constaté une diminution du nombre de lésions. Le père de cette personne, également atteint d'EBS-DM, a suivi le même traitement avec succès (Malkinson 1999). L'observation d'un effet de la tétracycline a poussé la tenue d'une étude visant à découvrir son mode d'action, et ce en utilisant la doxycycline (Lu *et al.* 2007). Cet autre membre du groupe tétracycline a été évalué chez un modèle murin et avait la capacité de secourir partiellement une souris dépourvue de kératine 5 (Lu *et al.* 2007). Par ailleurs, certaines données indiquent que les agrégats de kératines sont la cible de la machinerie des chaperonnes. Donc, une molécule qui module ce système pourrait s'avérer une thérapie intéressante pour l'EBS (Loffek *et al.* 2010).

1.6.4 Criblage à haut débit

Une piste de solution afin de trouver un traitement pour l'épidermolyse bulleuse simplex est le criblage de molécules à potentiel thérapeutique, où une banque de molécules aux fonctions diverses sont évaluées sur les cellules de personnes atteintes. Pour obtenir des résultats de criblage intéressants, il faut utiliser idéalement un système modèle qui reproduit les paramètres essentiels de la maladie à traiter et qui permet une identification efficace de composés ayant un effet bénéfique (Aiken *et al.* 2004). De tels criblages ont déjà été effectués, entre autres pour trouver des molécules capables de permettre le transport à la surface de la cellule de la protéine issue du gène *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) dans le cas de la fibrose kystique (Carlile *et al.* 2007). Pour procéder à cette étude, une étiquette a été fixée à la protéine CFTR contenant la mutation $\Delta F508$. Le rétablissement du transport signifiait la présence de cette étiquette à la surface cellulaire et sa détection par immunofluorescence (Carlile *et al.* 2007). Par la suite, 2000 composés provenant d'une collection de petites molécules ont été évalués par le biais de cet essai cellulaire. De ce nombre, 16 composés ont montré une fluorescence significativement plus élevée que celle du contrôle (Carlile *et al.* 2007). L'élimination des composés ayant une fluorescence intrinsèque a permis de conserver 5 composés, dont 4 n'étaient pas connus pour avoir un effet dans le transport de CFTR (Carlile *et al.* 2007). Cette étude a permis d'établir un système capable de détecter des molécules aptes à corriger le transport de protéines mutées (Carlile *et al.* 2007).

Comme toutes les techniques, le criblage à haut débit présente des avantages et des inconvénients. Les criblages phénotypiques ont pour avantage de fournir des informations biologiques telles que l'habileté d'un composé à améliorer le phénotype d'un modèle de maladie. Ils peuvent également fournir de l'information sur la toxicité d'un composé et sur sa capacité à pénétrer dans les cellules intactes ou les organismes entiers (Etzion et Muslin 2009). Cela permet donc d'augmenter à un rythme rapide l'acquisition de connaissances sur les voies thérapeutiques potentielles. Par contre, il faut

garder en tête que, bien que nombreuses, les données fournies par un criblage seront d'une utilité limitée si elles ne sont pas complétées par des études sur la cible contre laquelle les *hits* agissent (Bakan *et al.* 2008). Un des inconvénients liés à cette technique est le coût élevé nécessaire à son déroulement. Ces coûts incluent à la fois le matériel technologique pour le criblage, comme la manipulation robotique des plaques et le système de mesure, et les coûts liés aux réactifs et aux consommables. Cela peut devenir désavantageux dans le cas de réactifs biologiques sensibles, chers ou difficiles à produire ou encore dans le cas de technologies de mesure dispendieuses (Mayr et Bojanic 2009). De plus, les coûts associés à l'échec d'un composé augmentent de plus en plus au fur et à mesure de sa progression dans le processus de découverte de médicaments (Slater 2001). C'est pourquoi il est important d'effectuer le plus d'analyses possibles afin de s'assurer que seuls les composés de haute qualité poursuivent vers les étapes ultérieures au criblage (Slater 2001). Malgré tout, la proportion de composés identifiée par un criblage primaire demeure très faible, de l'ordre de 1-2% (Slater 2001). Un autre inconvénient à considérer est le développement des composés. Les caractéristiques d'un composé dont l'absorption, la solubilité, la distribution, la stabilité métabolique et la toxicité sont des éléments qui font en sorte que la plupart des *hits* ne seront pas développés (Giacomotto et Segalat 2010). Les composés qui doivent être éliminés en raison de leur toxicité représentent une des difficultés majeures des compagnies pharmaceutiques (Slater 2001). Un autre inconvénient de cette technique est qu'une grande partie des *hits* provenant des criblages se révèlent invalides après une évaluation chez des modèles animaux (Giacomotto et Segalat 2010). Des études tentent de contourner cette difficulté en effectuant des criblages directement chez des animaux entiers. Un des inconvénients de cette technique est l'interférence de certains composés dans l'essai. Différencier avec succès les composés qui ont une véritable activité contre la cible d'intérêt de ceux qui interfèrent avec des éléments du format de l'essai constitue un des défis des criblages à haut débit (Thorne *et al.* 2010). Les composés colorés, fluorescents ou qui s'agrègent sont susceptibles de poser des difficultés dans plusieurs formats d'essais, biochimiques ou cellulaires (Thorne *et al.* 2010 ; Johnston 2011). Certains mécanismes des molécules

interférant dans l'essai, comme la précipitation ou l'instabilité, augmentent le taux de faux négatifs, tandis que d'autres, comme la réactivité chimique, l'opacité optique ou encore l'oxydation, augmentent le taux de faux positifs (Shoichet 2006). Les meilleures manières d'identifier le plus tôt possible la présence d'activité d'artéfacts consistent à prendre connaissance des types d'interférence auxquelles l'essai peut être exposé et à concevoir des essais utilisant une méthode alternative pour confirmer l'activité d'un composé (Thorne *et al.* 2010).

Même si le criblage à haut débit semble comporter plusieurs inconvénients, certains succès ont été notés au fil des ans. Une étude réalisée en 2005 auprès de 54 groupes de recherche effectuant des criblages à haute densité a permis de constater que 26 d'entre eux avaient des molécules provenant de criblage impliquées dans un essai clinique pour l'évaluation chez l'homme (Fox *et al.* 2006). De ces 104 composés, 62 sont issus de 17 laboratoires effectuant des criblages à haut débit et 42 sont issus de laboratoires effectuant des criblages à moyen débit (Fox *et al.* 2006). De plus, quatre composés issus de criblages effectués en 1984, 1989 et 1999 sont maintenant accessibles sur le marché (Fox *et al.* 2006). Cela signifie qu'il est possible d'effectuer un criblage à haut débit où des molécules ayant bel et bien un effet sont identifiées, puis développées jusqu'à devenir une thérapie sur le marché.

Un des paramètres cruciaux d'un criblage à haut débit est le moyen par lequel sera évalué le fonctionnement de l'essai (*readout*). Pour tous les types d'essais, ce paramètre détermine l'interaction d'une molécule avec sa cible par le biais d'une conséquence fonctionnelle (Moore et Rees 2001). Dans les essais cellulaires, le paramètre de mesure est sensible à une voie de signalisation spécifique ou sensible à des changements du phénotype de la cellule (Jacobson *et al.* 2010 ; Michelini *et al.* 2010). Les avantages de tels paramètres incluent leur sensibilité aux effets cytotoxiques ou à la perméabilité

cellulaire des composés évalués (Jacobson *et al.*, 2010). D'autres essais cellulaires mesurent la prolifération cellulaire, la toxicité, la production d'un marqueur, la motilité, la variation dans le métabolisme (pH intracellulaire ou potentiel membranaire) ou le changement de niveau d'un métabolite messager intracellulaire (Moore et Rees 2001 ; Michelini 2010). Par exemple, des études visant à trouver des antagonistes de la voie Wnt ont utilisé plusieurs types de paramètres de mesure dont des gènes rapporteurs luciférase (Park *et al.* 2006 ; Chen *et al.* 2009 ; Huang *et al.* 2009 ; Pelletier *et al.* 2009), des anticorps conjugués à la phosphatase alcaline reconnaissant les complexes *T-cell factor* (TCF)/ β -caténine (Lepourcelet *et al.* 2004) et des promoteurs indépendants de la différenciation (Waki *et al.* 2007).

Cependant, dans le contexte de l'EBS, un tel *readout* n'est pas encore disponible, ce qui fait en sorte que les criblages à haut débit ne sont pas accessibles pour le moment. En effet, le moyen de mesurer l'effet d'une molécule en ce moment est la diminution du nombre de cellules contenant des agrégats après un prétraitement et un choc thermique (Chamcheu *et al.* 2009 ; Chamcheu *et al.* 2010 ; Chamcheu *et al.* 2011). Cependant, il n'est pas certain que la diminution du nombre d'agrégats soit un effet direct de la molécule ou encore soit bénéfique pour le patient (Chamcheu *et al.* 2011). Par ailleurs, il a été observé que les agrégats sont des assemblages dynamiques (Werner *et al.* 2004). Il est donc possible qu'ils se reforment et que leur disparition ne soit qu'un effet temporaire de la molécule. Aussi, la suppression des agrégats ne garantit pas un assemblage correct des kératines restantes. De plus, cette méthode serait difficilement transposable en un essai cellulaire pratique pour un criblage à haut débit. Effectivement, elle requiert la culture de cellules en grandes quantités alors que les cellules de patients EBS sont plutôt rares. Ensuite, il faut utiliser l'immunofluorescence pour détecter les agrégats, ce qui fait grandement augmenter les coûts de la technique en raison de l'usage d'anticorps à grande échelle. Finalement, il faut compter les cellules pour toutes les conditions de l'essai, ce qui est coûteux au niveau du temps investi pour obtenir un résultat. Un dernier point à considérer est que chez certains patients,

aucun agrégat n'est observé, et ce même après un choc thermique. Donc, à moins de trouver un *readout* plus spécifique pour réaliser l'essai cellulaire, ou de démontrer hors de tout doute que celui utilisé en ce moment est le meilleur pour mimer la physiopathologie et efficace pour détecter un effet thérapeutique, le criblage à haut débit semble précipité.

CHAPITRE 2

CHAPERONNES

2.1 Chaperonnes moléculaires

Les chaperonnes moléculaires sont des protéines impliquées dans le repliement correct des polypeptides. Elles jouent également un rôle dans leur synthèse, leur désassemblage et leur translocation (Jakob *et al.* 1993). La première utilisation du terme chaperonne moléculaire concernait la nucléoplasmine, pour son habileté à prévenir l'agrégation entre les histones et l'ADN (Quinta *et al.* 2011). Le terme cochaperonne quant à lui s'applique aux protéines qui assistent les chaperonnes ou encore qui leur sont associées (Quinta *et al.* 2011). Les protéines de choc thermique, découvertes initialement chez la drosophile après une exposition à une température élevée, constituent la famille de protéines la plus abondante de la biosphère (Ritossa 1962, Kaufmann 1990). Une partie de ces protéines est exprimée de manière constitutive dans la cellule tandis que l'autre partie est constituée de protéines qui sont régulées à la hausse lorsque l'organisme fait face à un stress (Mymrikov *et al.* 2011). Les protéines de choc thermique ont un rôle de contrôle de la qualité des autres protéines, assurant qu'elles soient dans leur forme native ou qu'elles soient dégradées, selon le cas (Morimoto et Santoro 1998 ; Bukau *et al.* 2006).

Il existe plusieurs familles de chaperonnes soit HSPA (connue anciennement comme Hsp70), HSPB (petites protéines de choc thermique), HSPC (Hsp90), HSPD/E (Hsp60/Hsp10), HSPH (Hsp110), CCT (*Chaperonin containing TCP-1*) (TRiC ; *TCP-1 Ring Complex*) et DNAJ (Hsp40) (Vos *et al.* 2008 ; Kampinga *et al.* 2009). Un groupe de ces protéines est impliqué dans le repliement, un second groupe agit comme cochaperonnes et un troisième groupe veille à l'attachement des protéines mal repliées et à leur transport vers les autres chaperonnes ou vers la machinerie de dégradation (Haslbeck *et al.* 2005 ; Vos *et al.* 2008).

Parmi les familles de chaperonnes, la plus conservée est HSPA (Hsp70) (Quinta *et al.* 2011). Chez l'homme, deux isoformes de la protéine Hsp70 sont retrouvées. Tout d'abord, une première forme provenant du gène *HSPA1*, dont la protéine est nommée Hsp72 et qui est régulée à la hausse à la suite d'un stress (Quinta *et al.* 2011). Ensuite, une seconde isoforme provenant du gène *HSPA8*, dont la protéine est connue sous le nom Hsp73 ou Hsc70 et qui est exprimée de manière constitutive dans la cellule (Quinta *et al.* 2011). Ces deux protéines se ressemblent beaucoup au niveau de leur fonction au sein du métabolisme cellulaire, mais Hsp70 est plus efficace (Gebauer *et al.* 1997 ; Angelidis *et al.* 1999 ; Takayama *et al.* 1999). Les protéines de cette famille ont besoin de deux partenaires pour effectuer leur fonction, une protéine de la famille DNAJ (Hsp40) et un facteur d'échange de nucléotide (NEF) (Kampinga et Craig 2010). Pour accomplir sa fonction de repliement de protéines, Hsp70 fait appel à une série de cycles dépendant de l'ATP (figure 12) (Kalia *et al.* 2010, Kampinga et Craig 2010). Pour ce faire, la protéine fait appel à deux domaines ; un domaine ATPase situé à son extrémité N-terminale et un domaine de liaison au peptide situé à son extrémité C-terminale (Kalia *et al.* 2010). C'est ce dernier domaine qui permet la liaison avec un peptide mal replié (Beissinger et Buchner 1998 ; Bukau et Horwich 1998 ; Hartl et Hayer-Hartl 2002 ; Nollen et Morimoto 2002). Par la suite, le domaine ATPase hydrolyse un ATP, ce qui entraîne un changement de conformation du domaine C-terminal lié au peptide (Kalia *et al.* 2010). À cette étape, le complexe formé de la chaperonne, du substrat et de l'ADP est considéré comme étant dans une forme stable (Kalia *et al.* 2010). Au cours de l'étape suivante, l'ADP est relâché, ce qui entraîne le relâchement du substrat puisque le complexe est maintenant dans une forme plus instable (Kalia *et al.* 2010).

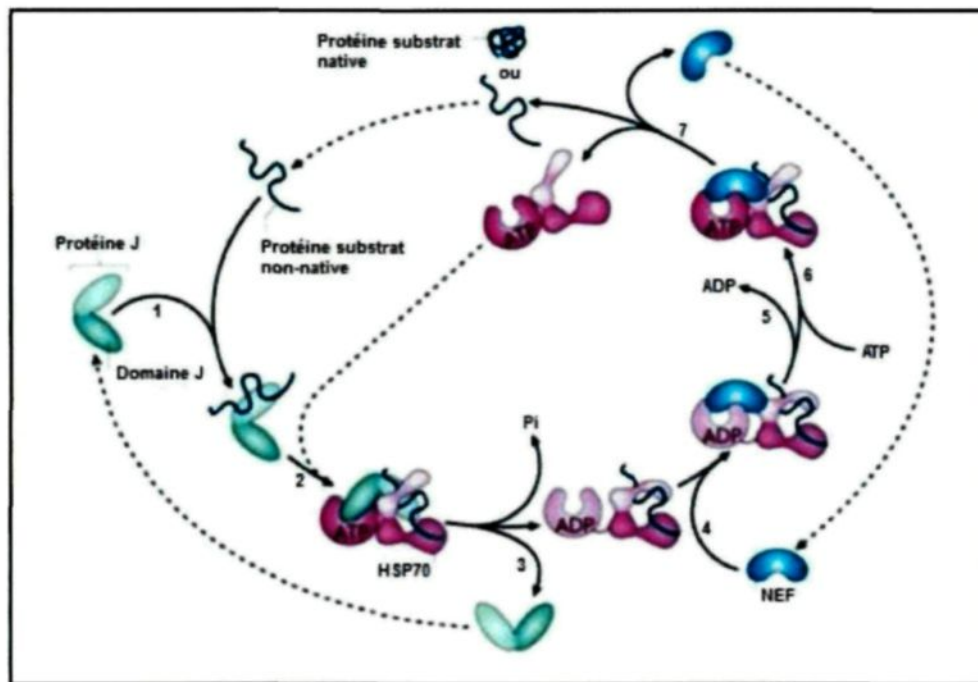


Figure 12: Le cycle d'Hsp70

1) Le domaine de liaison de la protéine J permet son attachement à la protéine substrat. 2) Le complexe se lie ensuite à Hsp70 grâce au domaine J. 3) Le substrat interagit avec le domaine de liaison de peptide d'Hsp70. L'ATP est hydrolysé ce qui modifie la conformation d'Hsp70 et permet à la protéine J de quitter le complexe. 4) Le facteur d'échange de nucléotide (NEF) vient se lier au complexe Hsp70-substrat. 5) L'ADP quitte le complexe et 6) un ATP vient prendre sa place. 7) Le substrat est relâché et le cycle recommence si l'état natif n'est pas atteint. Modifiée de (Kampinga et Craig 2010)

Une étude sur la maladie de Huntington a rapporté qu'Hsp70 y jouerait un rôle cytoprotecteur. En effet, il empêcherait l'agrégation de la polyglutamine mutée et réduirait la toxicité causée par cette dernière (Sakahira *et al.* 2002).

2.2 Chaperonnes chimiques

Les chaperonnes chimiques sont des molécules présentes naturellement chez certains organismes qui peuvent agir de la même façon que les chaperonnes moléculaires (Yancey 2004). Une autre définition consiste en des

drogues qui sont impliquées dans le repliement correct et le transport de protéines membranaires (Welch et Brown 1996 ; Fujiwara *et al.* 2013). Tout comme les chaperonnes moléculaires, ces chaperonnes ne donnent pas d'informations au processus de repliement (Welch et Brown 1996). Elles vont plutôt influencer le taux du processus de repliement ainsi que sa fidélité, en stabilisant la forme native du polypeptide (Schein 1990). Parmi les chaperonnes chimiques, on retrouve le triméthylamine N-oxyde (TMAO), le sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA), le tréhalose, l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le glycérol (Burrows *et al.* 2000 ; Rubenstein et Zeitlin 2000 ; Kubota *et al.* 2006 ; Crowe 2007 ; Wei *et al.* 2008). On croit que les chaperonnes chimiques auraient un effet bénéfique dans une variété de troubles causés par un mauvais repliement de protéines (Chaudhuri et Paul 2006). C'est la raison pour laquelle de telles molécules constituent une option thérapeutique intéressante dans de nombreuses maladies humaines (Chaudhuri et Paul 2006).

Au cours de ce mémoire, deux chaperonnes chimiques ont été évaluées ; le triméthylamine N-oxyde (TMAO) et le sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA). Elles seront décrites en détail dans les sections qui suivent.

2.2.1 Triméthylamine N-Oxyde (TMAO)

Le TMAO est une chaperonne qui a fait l'objet de plusieurs études de Chamcheu et ses collaborateurs, à la fois dans le contexte de l'EBS et dans le contexte de l'ichtyose épidermolytique (Chamcheu *et al.* 2009 ; Chamcheu *et al.* 2010 ; Chamcheu *et al.* 2011a ; Chamcheu *et al.* 2011b). Tout d'abord, en 2009, il a utilisé une lignée immortalisée d'un patient EBS généralisée ayant la mutation V186L dans la kératine 5 pour évaluer les effets du TMAO après un choc thermique (Chamcheu *et al.* 2009). Il a pu constater une réduction dépendante de la dose utilisée du nombre de cellules contenant des agrégats. Par la suite, il a étudié les effets du TMAO chez trois lignées de kératinocytes

primaires contenant une mutation distincte dans la K5, soit la lignée généralisée utilisée précédemment, et deux lignées EBS-DM, une ayant la mutation E475G et l'autre ayant la mutation I183M (Chamcheu *et al.* 2010). Encore une fois, une diminution du nombre de cellules contenant des agrégats a été constatée. Le fait que les résultats étaient semblables dans la lignée primaire et la lignée immortalisée V186L a consolidé l'hypothèse qu'une lignée immortalisée peut être utilisée pour évaluer des traitements (Chamcheu *et al.* 2010). Dans une troisième étude, les effets du TMAO et du 4-PBA ont été évalués chez les lignées immortalisées V186L et E475G (Chamcheu *et al.* 2011a). Le pourcentage de cellules contenant des agrégats a été significativement réduit après un prétraitement avec les deux molécules et ce, pour les deux lignées (Chamcheu *et al.* 2011a). Par ailleurs, cette étude a également tenté de démystifier le mécanisme d'action du TMAO en évaluant son effet sur deux chaperonnes moléculaires, Hsp70 et Hsp90, ainsi que sur des éléments de la voie du protéasome (Chamcheu *et al.* 2011a). Une augmentation du niveau de protéine Hsp70 a été constatée dans les lignées après un prétraitement au TMAO et un choc thermique tandis qu'aucun changement notable n'a été observé pour Hsp90 (Chamcheu *et al.* 2011a). L'ajout d'un inhibiteur de protéasome et d'un inhibiteur de *p38-mitogen-activated protein kinase* (MAPK) a permis de constater l'augmentation du nombre de cellules contenant des agrégats, ce qui pourrait impliquer cette voie dans la disparition des kératines mutées (Chamcheu *et al.* 2011a). Cependant, le traitement au TMAO a annulé les effets de l'inhibiteur du protéasome (Chamcheu *et al.* 2011a). Finalement, Chamcheu et ses collaborateurs ont étudié les effets du TMAO et du 4-PBA dans une autre maladie impliquant des agrégats de kératine mutée, l'ichtyose épidermolytique (Chamcheu *et al.* 2011b). Une réduction du nombre de cellules contenant des agrégats après un prétraitement et un choc thermique a été constatée dans les lignées immortalisées utilisées (Chamcheu *et al.* 2011b).

Le triméthylamine N-oxide (TMAO) est une molécule retrouvée chez plusieurs poissons, requins et crustacés et qui favorise une structure correcte des kératines mutées (Chamcheu *et al.* 2009 ; Chamcheu *et al.* 2010). Le

TMAO fait partie des osmolytes organiques, des composés dont le rôle consiste à maintenir la forme des cellules face à un stress hydrique (Yancey 2005). On recense cinq grandes catégories d'osmolytes : acides aminés libres et dérivés d'acides aminés, alcools et sucres polyhydriques, solutés méthylsulfonium, urée et méthylamines (Yancey *et al.* 1982 ; Yancey 2005). Les différents groupes d'osmolytes ont des caractéristiques communes, soit une solubilité aqueuse élevée, une polarité et une charge nulle à pH physiologique (Marshall *et al.* 2012). Le TMAO fait partie de la classe des méthylamines, incluant également la sarcosine et la triméthylglycine, et est impliqué dans le repliement correct des protéines et la liaison de ligands (figure 13) (Marshall *et al.* 2012). Il a également un rôle dans la défense contre certains types de perturbations (urée, ions et pression hydrostatique) (Celinsky et Scholtz 2002 ; Yancey 2005). Un indice de son implication contre la pression hydrostatique repose sur l'observation que la quantité retrouvée chez les poissons varie d'absent à moins de 100 mmol/kg chez les organismes d'eau peu profonde à 300 mmol/kg chez les organismes d'eau profonde (Yancey 2005). Le TMAO a pour fonction de stabiliser les protéines, c'est-à-dire les maintenir correctement repliées afin qu'elles puissent exercer leur rôle (Yancey *et al.* 2001). Pour ce faire, le TMAO joue sur l'énergie libre des différentes conformations, soit native et dénaturée, afin de favoriser la conformation native de la protéine cible (Qu *et al.* 1998).

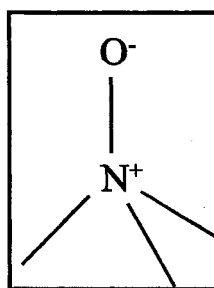


Figure 13: Structure du triméthylamine N-oxyde

Le TMAO est un osmolyte qui fait partie de la classe des méthylamines. Il est retrouvé chez certains poissons, requins et crustacés et est impliqué dans le repliement correct de protéines et la liaison de ligands (Marshall *et al.* 2012).

Cette molécule a un rôle dans certaines maladies humaines, dont la fibrose kystique, mais aussi dans la maladie à prion (Welch et Brown 1996 ; Howard *et al.* 2003 ; Bennion *et al.* 2004). De manière plus précise, le TMAO a été utilisé dans le contexte de la fibrose kystique afin de vérifier s'il était capable de rétablir le transport des ions Cl^- dans un modèle murin de la maladie (Fischer *et al.* 2001). De premiers essais utilisant des cellules contenant le récepteur CFTR ayant la mutation ΔF508 ont permis de démontrer qu'un traitement au TMAO résultait en la présence du récepteur sous sa forme mature et en une correction partielle de la perméabilité des ions Cl^- (Brown *et al.* 1996). Lors des expérimentations avec les souris, une correction partielle du trafic de Cl^- a été observée, cependant la dose nécessaire pour parvenir à ce résultat causait de la toxicité aux souris, ce qui met en péril une future utilisation clinique (Fischer *et al.* 2001). En ce qui concerne la maladie à prion, Tatzelt et son équipe ont démontré que le TMAO avait un effet bénéfique (Tatzelt *et al.* 1996). Leurs recherches ont permis de constater qu'un traitement au TMAO de neuroblastomes murins infectés de cette maladie permettait la réduction de la formation de la protéine de prion infectieuse à partir de la protéine de prion cellulaire (Tatzelt *et al.* 1996). Cependant, aucun effet n'a été observé sur la population existante de la protéine de prion infectieuse (Tatzelt *et al.* 1996). Ces chercheurs ont donc émis l'hypothèse que les chaperonnes permettraient de maintenir la forme hélicoïdale de la protéine de prion cellulaire, l'empêchant ainsi d'atteindre la conformation infectieuse (Tatzelt *et al.* 1996).

Le TMAO a également été évalué dans le contexte du diabète insipide néphrogénique. Dans cette étude, il a été démontré qu'un traitement au TMAO de cellules transfectées réduit la rétention dans le réticulum endoplasmique de la protéine aquaporine-2 mutée (Tamarappoo et Verkman 1998). Par ailleurs, une autre étude a démontré que le TMAO aurait également la capacité de "camoufler" les effets de certaines mutations qui empêchent le repliement de la protéine (Bandyopadhyay *et al.* 2012). Ils ont démontré qu'il est possible de rendre le repliement d'une protéine dépendant au TMAO, et ce en ajoutant certaines mutations dans la protéine cible (Bandyopadhyay *et al.* 2012). Cette

étude a déterminé que les mutations entraînant une dépendance à l'osmolyte TMAO étaient principalement situées à la surface de la protéine (Bandyopadhyay *et al.* 2012).

Le TMAO a également été étudié dans d'autres contextes que celui de maladies. Des expérimentations ont démontré la capacité du triméthylamine N-oxyde à induire la formation d'hélices dans un peptide ayant une base alanine (Celinsky et Scholtz 2002). Une évaluation des effets du TMAO a également été effectuée chez la levure. Chez cette dernière, l'ajout de TMAO au milieu de culture permet la survie des levures dans un milieu sans cystéine (Singh *et al.* 2007). Il peut également augmenter l'activité enzymatique de quatre protéines cystathionine β -synthase humaine contenant chacune une mutation distincte (Singh *et al.* 2007).

2.2.2 Sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA)

Parmi les chaperonnes chimiques, se retrouve le 4-phénylbutyrate (4-PBA), qui a été utilisé, à titre d'exemple, pour traiter des troubles du cycle de l'urée et qui favorise également un repliement correct des kératines mutées (Rubenstein et Lyons 2001). Cette molécule est en fait un acide gras aromatique retrouvé naturellement chez les humains (figure 14) (Spira et Carducci 2003 ; Iannitti et Palmieri 2011). Il est impliqué dans une voie métabolique où son oxydation le transforme en phénylacétate, composé qui se conjugue par la suite avec la glutamine devenant le phénylacétylglutamine (Brusilow 1991). Cet élément est par la suite excrété dans l'urine et c'est grâce à cette voie que le 4-PBA peut être utilisé dans les troubles du cycle de l'urée (Brusilow 1991). Le 4-PBA est une chaperonne chimique étudiée par Chamcheu et ses collaborateurs dans le contexte de l'EBS et de l'ichtyose épidermolytique (Chamcheu *et al.* 2011a ; Chamcheu *et al.* 2011b). Une réduction du nombre de cellules contenant des agrégats a été observée dans le contexte des deux maladies (Chamcheu *et al.* 2011a ; Chamcheu *et al.* 2011b).

Par ailleurs, il a été constaté dans le cas de l'ichtyose épidermolytique que cette molécule augmentait l'expression d'Hsp70, mais son mécanisme d'action dans le cas des kératines mutées des patients EBS reste à déterminer (Chamcheu *et al.* 2011b).

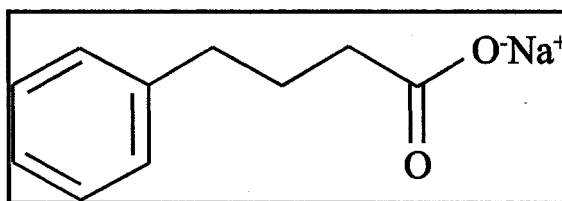


Figure 14: Structure du sodium 4-phénylbutyrate

Le 4-PBA est un acide gras retrouvé naturellement chez les humains. Il possède des propriétés de chaperonne chimique, d'inhibiteur d'histone déacétylase et d'éliminateur de l'urée (Iannitti et Palmieri 2011).

En plus d'éliminer l'ammoniac, le 4-PBA a également des propriétés en tant que chaperonne chimique et aussi comme inhibiteur d'histone déacétylase (Maestri *et al.* 1996 ; Liu *et al.* 2004 ; Qi *et al.* 2004 ; Scaglia *et al.* 2004 ; Ryu *et al.* 2005 ; Ozcan *et al.* 2006). Cette seconde caractéristique permet l'implication de cette molécule au niveau de l'épigénétique. En effet, l'acétylation des histones résulte en une conformation plus relâchée qui favorise la transcription (Strahl et Allis 2000 ; Chang et Min 2002 ; Monneret 2005 ; Grayson *et al.* 2010). Au contraire, la déacétylation correspond à une forme plus contractée des histones et donc à une réduction de la transcription (Strahl et Allis 2000 ; Chang et Min 2002 ; Monneret 2005 ; Grayson *et al.* 2010). L'inhibition des enzymes de déacétylation, telle qu'effectuée par le 4-PBA, permet donc de favoriser la transcription (Iannitti et Palmieri 2011).

Le sodium 4-phénylbutyrate a été utilisé dans plusieurs contextes et divers effets ont été observés. Il a été rapporté qu'il pouvait induire la différenciation *in vitro* de lignées cellulaires humaines du cancer de la prostate (Carducci *et al.* 1996). Un effet anti-tumeur *in vitro* a également été recensé

dans plusieurs autres cancers incluant entre autres le carcinome du colon, le lymphome de Burkitt et le rétinoblastome (Iannitti et Palmieri 2011).

Le 4-PBA a été utilisé comme chaperonne chimique dans le contexte de la fibrose kystique (Zeitlin *et al.* 2002). Lors de cette étude, le rétablissement du trafic de la protéine responsable de la maladie, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), contenant la mutation $\Delta F508$ a été constaté à la fois *in vitro* et *in vivo* après ajout de 4-PBA (Zeitlin *et al.* 2002). Ce rétablissement du trafic serait associé avec des changements des chaperonnes résidant dans le réticulum endoplasmique (Singh *et al.* 2008). Une autre étude a démontré qu'il y aurait une inhibition d'Hsc70 à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine provoquée par le 4-PBA (Rubenstein et Lyons 2001). Dans une étude visant à déterminer le mécanisme d'action du 4-PBA, les interactions entre CFTR et Hsc70 ont été mesurées (Rubenstein et Zeitlin 2000). Avant le traitement au 4-PBA, des complexes sont observés entre CFTR et Hsc70, ce qui mène à la dégradation de la protéine CFTR mutée. Après le traitement, le nombre de complexes observé a diminué et des expériences ultérieures ont démontré que le 4-PBA réduit les niveaux d'ARNm et d'immunoréactivité d'Hsc70 (Rubenstein et Zeitlin 2000). Cela signifie qu'un plus grand nombre de protéines CFTR mutées atteint la surface cellulaire en échappant à une interaction avec la chaperonne Hsc70 (Rubenstein et Zeitlin 2000).

Le 4-PBA semble donc avoir un effet bénéfique sur diverses protéines agrégées ou coincées dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène a été rapporté pour la protéine *Parkin-associated endothelin receptor-like factor* (Pael-R) impliquée dans le parkinson juvénile (Kubota *et al.* 2006). Cet effet favorable a aussi été observé dans le cas du *serotonin transporter* (SERT) où dans une lignée COS-7, la quantité de protéine mature a augmenté tandis que le stress du réticulum endoplasmique était réduit (Fujiwara *et al.* 2013). Le 4-PBA a augmenté la quantité de protéine $\alpha 1$ -antitrypsine ($\alpha 1$ -AT) sécrétée qui était retenue dans le réticulum endoplasmique de cellules hépatiques (Burrows

et al. 2000). Kubota et ses collaborateurs ont démontré que le sodium phénylbutyrate empêchait l'agrégation de α -lactalbumine et d'albumine de sérum bovin dénaturé, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Kubota et al. 2006). Des études précédentes ayant rapporté que le 4-PBA diminuait l'expression d'Hsc70 tout en augmentant celle d'Hsp70, des expériences ont été entreprises afin de vérifier si le 4-PBA modifiait le niveau de *glucose-regulated protein 78* (GRP78) et de GRP94, des chaperonnes du réticulum endoplasmique (Kubota et al. 2006). Cependant aucun effet de la molécule n'a été observé, à la fois au niveau de l'ARNm qu'au niveau des protéines, excluant cette voie dans le mécanisme protecteur du 4-PBA contre le stress dans le réticulum endoplasmique (Kubota et al. 2006). Dans une étude réalisée par Datta et son équipe, il a été démontré que le traitement à l'acide 4-phénylbutyrique de l'hormone préproparathyroïde humaine contenant la mutation C18R empêche l'accumulation de cette dernière dans le réticulum endoplasmique (Datta et al. 2007). Dans le cas de l'hémochromatose héréditaire, le 4-PBA va plutôt permettre la dégradation de la protéine mutée HFE C282Y (de Almeida et al. 2007).

2.3 Hypothèses et objectifs

Jusqu'à ce jour, aucune thérapie efficace à long terme n'est disponible pour soigner l'EBS. De nombreuses études sur des agents pharmaceutiques potentiels, parmi lesquels des chaperonnes chimiques, ont été réalisées. Puisque l'EBS est une maladie où l'on observe un mauvais repliement des kératines mutées, l'ajout de chaperonnes chimiques dont le rôle est de favoriser un repliement correct semble une solution thérapeutique viable. C'est pourquoi l'objectif de ce mémoire est d'évaluer le potentiel thérapeutique de deux chaperonnes chimiques, le TMAO et le 4-PBA, chez des kératinocytes immortalisés provenant de patients atteints d'EBS causée par une mutation dans la kératine 14. De plus, des essais seront effectués afin de déterminer un mécanisme d'action potentiel dans le cas d'un effet bénéfique de l'un des composés.

CHAPITRE 3

EVALUATION OF THE IMPACT OF TWO CHAPERONES (TMAO AND 4-PBA) ON KERATIN AGGREGATES IN KERATINOCYTES ISOLATED FROM *KRT14* EPIDERMOLYSIS BULLOSA SIMPLEX INDIVIDUALS

Résumé

Les filaments intermédiaires (IF) sont des éléments structuraux majeurs du cytosquelette et fournissent une résistance aux cellules dans lesquelles ils sont exprimés. Une mutation dans l'un de ceux-ci est la cause de plusieurs troubles héréditaires rares où la cellule ou le tissu affecté est affaibli, et de ce fait ne peut pas composer avec le stress, comme c'est le cas pour l'épidermolyse bulleuse simplexe (EBS). EBS est une maladie bulleuse rare de la peau transmise de manière autosomique dominante, est causée par des mutations affectant les gènes de la kératine 5 (*KRT5*) ou de la kératine 14 (*KRT14*), les deux kératines majeures exprimées dans la couche basale de l'épiderme, et résulte en l'agrégation du cytosquelette de kératine et en la cytolysse intracellulaire.

Les options thérapeutiques pour l'EBS sont rares, essentiellement symptomatiques et palliatives, et sont principalement restreintes aux émollients. Pour cette raison, un besoin clair existe pour l'élaboration de nouvelles thérapies. Il a été observé que certaines mutations EBS mènent à des agrégats de kératine et que ce trouble compromet probablement le repliement de protéines. Par conséquent, les médicaments tels que les chaperonnes, qui sont impliquées dans le processus de repliement de protéines, pourraient réduire ces agrégats. Donc, nous avons établi quatre lignées immortalisées de kératinocytes isolées d'un contrôle sans EBS (CTRL) et de trois individus EBS portant chacun une mutation spécifique de K14 et nous avons évalué l'efficacité thérapeutique de deux chaperonnes chimiques : triméthylamine N-oxyde (TMAO) et sodium 4-phénylbutyrate (4-PBA) sur des lignées cellulaires immortalisées soumises à un stress thermique. En se basant sur des études

précédentes ayant utilisé ces chaperonnes, deux mécanismes d'action possibles ont été évalués : la quantification de l'expression de deux kératines différentes et l'augmentation des niveaux de protéine de la protéine de choc thermique 70 (Hsc70). Les résultats démontrent une certaine efficacité du TMAO dans la réduction du nombre d'agrégats de kératine dans deux lignées cellulaires EBS soumises à un stress thermique et aucune toxicité pour les kératinocytes. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour l'expression des kératines et pour la production de Hsc70. Nous suggérons une thérapie basée sur un agent chimique pour réduire l'effondrement du cytosquelette de kératine observé dans le phénotype EBS.

EVALUATION OF THE IMPACT OF TWO CHAPERONES (TMAO AND 4-PBA) ON KERATIN AGGREGATES IN KERATINOCYTES ISOLATED FROM *KRT14* EPIDERMOLYSIS BULLOSA SIMPLEX INDIVIDUALS

Authors list: Mbarka Bchetnia^{*a}, Jacynthe Lacroix^{*a}, Tarik Farez^a, Georgette Leclerc^b, Julie Powell^c, Catherine McCuaig^c, Audrey Dupéré^b, Charles Morin^b, Valérie Legendre-Guillemain^a et Catherine Laprise^a

^a Université du Québec à Chicoutimi, Département des sciences fondamentales, Saguenay, Canada.

^b Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi, Saguenay, Canada.

^c Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada.

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding Author:

Catherine Laprise, Ph.D.

Université du Québec à Chicoutimi

Département des sciences fondamentales, P4-2150

555 boulevard de l'Université, Saguenay (Québec) G7H 2B1.

Tel (418) 545-5011 extension 5659

Fax (418) 615-1203

E-mail address: catherine.laprise@uqac.ca

Abstract

Intermediate filaments (IFs) form major structural elements of the cytoskeleton and provide resilience to the cells in which they are expressed. A mutation in one of them is the cause of many inherited rare disorders where the cell or tissue affected is weakened, and therefore cannot compose with stress, as seen in Epidermolysis Bullosa Simplex (EBS). EBS is a rare mechanobullous skin disease inherited in an autosomal dominant manner. This disorder is due to mutations affecting keratin 5 (*KRT5*) or keratin 14 (*KRT14*) genes, the two major keratins expressed in the epidermis basal layer, and results in the aggregation of the keratin cytoskeleton and intracellular cytolysis.

Therapeutic options for EBS are scarce, essentially symptomatic and palliative, and mainly limited to emollients. Therefore a clear need exists for devising novel therapies. It has been observed that some EBS mutations lead to keratin aggregates and that this is probably the consequence of improper protein folding. Hence, drugs such as chaperones, which are implied in the protein folding process, could prevent or reduce the number of aggregates. Therefore, we established four immortalized keratinocyte lines isolated from one healthy control (CTRL) and from three EBS patients carrying each a specific mutation in K14 and evaluated the therapeutic efficiency of two chemical chaperones: trimethylamine N-oxide (TMAO) and sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) in heat-stressed immortalized cell lines. Based on previous studies using these chaperones, two possible mechanisms of action were assessed; the quantification of the expression of two different keratins and the increase of heat shock protein 70 (Hsc70) protein levels. Results show some efficiency of TMAO in reducing the number of keratin aggregates in two heat-stressed EBS cell lines with an absence of toxicity for the keratinocytes. However, no significant differences on the level of expression of keratins and Hsc70 after TMAO treatment. We suggest a chemical-based strategy to reduce keratin network collapses in the EBS phenotype.

Introduction

Type II keratin 5 (*KRT5*) and type I keratin 14 (*KRT14*) are the major keratin pairing expressed in basal keratinocytes of the epidermis and in related stratified epithelia (Loffek *et al.* 2010). These keratins are involved in the keratin cytoskeleton and a mutation in one member of the pair will result in a weakened integrity. Eventually, it will cause intracellular lysis, a characteristic of the dermatological disorder Epidermolysis Bullosa Simplex (EBS) (Loffek *et al.* 2010). EBS is a mainly dominantly inherited fragility condition primarily affecting the epidermis (Gu and Coulombe 2007). Some reports have suggested that the EBS phenotype may be exacerbated by fever and/or hot weather (Morley *et al.* 1995). To date, effective EBS therapies are still lacking and current ones are directed toward amelioration of specific tissue damage (Chamcheu *et al.* 2011). Chaperones are constituted of families of proteins whose main function is to promote the correct folding of polypeptides (Hartl and Heyer-Hartl 2002). Some chaperones are expressed constitutively in the cell whereas others are upregulated when the cell faces some kind of stress (Quintà *et al.* 2011). Molecules called chemical chaperones may act the same way as molecular chaperones and thus stimulate the correct folding of proteins (Fujiwara *et al.* 2013). Since EBS is a misfolding protein disorder, the addition of molecular chaperones to correct the folding of aggregated proteins seems a viable therapeutic option. In this study, keratin cytoskeleton abnormalities of three established severe keratin-mutant cell lines from EBS patients (EBS6, EBS1 and EBS4), carrying respectively the R125S, I377T and I412F mutations within K14, were compared to a control keratinocyte line (CTRL) before and after challenge with heat-shock and when pre-treated by one of two chemical chaperones (TMAO or 4-PBA). TMAO is an osmolyte present in deepwater fishes and has a hydrophobic nature (Yancey 2005). It acts as a chemical chaperone and is important to counteract the protein destabilizing effect of urea and hydrostatic pressure. TMAO has an action on protein folding and stabilization (Gong *et al.* 2009). 4-PBA is a fatty acid of low molecular weight that has been shown to increase the lifespan of *Drosophila* (Kang *et al.* 2002) and to have a beneficial effect in multiple sclerosis, both for the neuroinflammation and the disease process (Dasgupta *et al.* 2003). This

molecule has also been used as a therapy in urea cycle disorders (Maestri *et al.* 1996), spinal muscular atrophy (Andreassi *et al.* 2004), sickle cell disease and β -thalassemia (Dover *et al.* 1994; Collins *et al.* 1995). Furthermore, a number of studies published recently have described the use of 4-PBA as a chemical chaperone to reverse the mislocalization and/or aggregation of proteins (Burrows *et al.* 2000; Rubenstein and Zeitlin 2000; Chamcheu *et al.* 2010). Since keratin aggregates are a feature observed in EBS cells but not in non EBS cells, the number of aggregate-containing cells can be used as a readout to determine a potential effect of the chemical chaperones (Werner *et al.* 2004). The immortalized EBS6 cell line was very vulnerable to heat-shock, whereas the two others EBS cell lines were less vulnerable, and exhibited reduction in the number of cells containing keratin aggregates when pretreated by the chemical molecules assayed. In the control cell line, the formation of cytoplasmic keratin filament aggregates in response to heat-shock treatment was less than that observed in EBS cell lines. Assays to determine a possible mechanism of action via the upregulation of the expression of *KRT16* or *KRT17* that could replace the mutated *KRT14* (Kerns *et al.* 2007; Coulombe *et al.* 2009) or the enhanced production of Hsc70 that could be triggered by TMAO (Chamcheu *et al.* 2011) did not yield any significant results.

Materials and methods

Immortalized keratinocytes establishment

We established four new primary and stable keratinocyte lines from one healthy control (CTRL) and from one severely affected generalized EBS-DM patient (EBS Dowling-Meara) (EBS6), with a p.Arg125Ser substitution in K14 that we previously genetically defined in (Bchetnia *et al.* 2012). The two others EBS cell lines (EBS1 and EBS4) have a p.Ile377Thr and a p.Ile412Phe substitution respectively as previously described. (Rugg *et al.* 2007; Bolling *et al.* 2011) The ethic committee from the Montreal and Chicoutimi hospitals approved the study and the four subjects gave their informed consent. Primary cultures were established from non-blistered skin using standard protocols

(Rheinwald and Green 1975). Cells were maintained in standard keratinocyte tissue culture medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 25% Ham's F12 medium, 10% fetal calf serum, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 10⁻¹⁰ M cholera toxin, 5 µg/ml human transferrin, 1.3 ng/ml thyronine, 24.3 µg/ml adenine, 5 µg/ml bovine insulin, 10 ng/ml human recombinant epidermal growth factor supplemented with 3T3 fibroblast feeder cells. Primary keratinocyte lines were immortalized by co-plating with mitomycin C-treated PT67 retroviral producer cells producing a recombinant retrovirus expressing E6 and E7 (kindly provided by Dr Baki Akgul, Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany) (Chamcheu *et al.* 2009). Three to four days later, producer cells were selectively removed and mitomycin C-treated 3T3 feeder cells were added to the culture, a day prior to selection. Transductants were selected with G418 (70-100 µg/ml for 5 days). Feeder cells dependency was checked regularly after transduction and when cells became independent, they were routinely cultured in the classic medium described above. To limit the impact of further genetic variation, immortalized EBS6, EBS1 and EBS4 cells were evaluated for the presence of the characteristic R125S, I377T or I412F K14 mutation (data not shown) and all experiments were carried out on cells with almost identical passages between control and EBS cases.

Tableau 1: Phenotypes and mutations found in three EBS cases

Case	Sex*(age)	Phenotype	<i>KRT14</i> mutation	K14 mutation	Exon	Domain	Reference
EBS6	M(26)	Dowling-Meara	373C>A	R125S	1	1A	Bchetnia <i>et al.</i> , 2012
EBS1	M(32)	Localized	1130T>C	I377T	6	2B	Rugg <i>et al.</i> , 2007
EBS4	F(8)	Localized	1295A>T	I412F	6	2B	Bolling <i>et al.</i> , 2011

*M: male; F: female

Keratinocyte lines heat-shock and pre-treatment with different compounds

Immortalized EBS6 and non EBS (CTRL) keratinocytes were cultured in 24-well plates on 13 mm cover slips in duplicates, and then were subjected to thermal stress as previously described with slight modifications (Chamcheu *et al.* 2009). Briefly, cells were heat-shocked at 43°C for 35 min followed by a recovery period of 15 min. Dose-response curves were established for each of the molecule to determine the optimal dose and time of incubation. Then, in a subset of experiments (three for each molecule), keratinocytes were pre-treated with one of the two chemical molecules trimethylamine N-oxide (TMAO) (150 mM, Sigma-Aldrich) or sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) (10 mM, Calbiochem) dissolved in culture medium and subsequently cultured for 24h prior to thermal stress. Cells were then processed for immunofluorescence staining. Replication assays for TMAO were done with the immortalized EBS1 and EBS4 cell lines.

Immunofluorescence

Coverslips were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and permeabilized for 4 min at room temperature with Triton stabilization buffer (PBS, 0.2% Triton X-100). Unspecific binding epitopes were blocked with 5% normal goat serum, 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min. Subsequently, cells were incubated with an anti-K5 primary antibody diluted in a blocking solution (1% BSA in PBS) (Clone XM26, 1:65 dilution; Cedarlane, ON, Canada). Then, cells were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Cy3 (1:800 dilution; Cedarlane, ON, Canada). Incubation steps with primary and secondary antibodies were performed for 90 min and 45 min respectively. Subsequently, after washing in PBS followed by distilled deionized water, coverslips were mounted on glass slides using Dako fluorescent mounting medium (Dako). Slides were examined using an inverted fluorescence microscope (AxioObserver, Zeiss, Germany) and 500 cells were counted for all the conditions in each experiment in the duplicate coverslips. Pictures of representative fields were taken using the AxioVision software (Rel. 4.8, Zeiss, Germany). Data analysis was performed using Student's t-test.

48

Results are expressed as mean of cells with aggregates \pm SD. Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

Evaluation of the cytotoxicity

Toxicity of each molecule on cells was assayed using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). This kit allows for the measurement of lactate dehydrogenase (LDH), a cytosolic enzyme released in the medium upon cell lysis. First, the optimal number of cells for the assay was determined according to manufacturer's recommendations. Then, cells from control and EBS patients were seeded in a 96-well V-bottom plate. Twenty-four hours later, keratinocytes were treated with a molecule (TMAO for EBS6, EBS1 and EBS4, 4-PBA for EBS6) as in the immunofluorescence assay. After treatment, an aliquot of the medium was spun down in a second plate. In the first plate, the medium was replaced and lysis solution (9% (v/v) Triton X-100) was added to each well for one hour at 37°C. Then, supernatants of both plates were transferred to a third plate (96-well flat bottom) and the enzymatic solution was added in all of the wells. After a 30 min incubation in the dark at room temperature, the stop solution (1 M acetic acid) was added and the absorbance was measured at 490 nm. Data analysis was performed using Student's t-test. Results are expressed as mean of necrosis \pm SD. Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

qRT-PCR

KRT16 and *KRT17* mRNA expression by real-time PCR was done twice in triplicate with negative controls with or without TMAO pre-treatment for the CTRL, EBS6, EBS1 and EBS4 cell lines. Briefly, total RNA was extracted from confluent cell layers using the RNAeasy plus Mini Kit (Qiagen, ON, Canada) according to manufacturer's recommendations. qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, MD, USA) with oligodT(20) primers were used for cDNA synthesis. The RT-PCR reaction was performed using TaqMan technology in

the Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) with 0.67 ng of cDNA, TaqMan primers (Applied Biosystems, ON, Canada) and Perfecta qPCR ThermoMix (Quanta Biosciences, MD, USA) for a final volume of 20 μ l. Quantification of gene expression was performed using the two standard curves method and significant differences of expression were assessed using the Student's t-test ($P < 0.05$). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene.

Preparation of cell lysates for Western Blot

Cell lysates were prepared as described elsewhere (Chamcheu *et al.* 2011). Cells were washed twice in cold PBS and scraped after addition of lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.5% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) deoxycholate, 10 mM EDTA, 30 mM sodium pyrophosphate, 150 mM NaCl). Just before use 0.5 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 ng/ml aprotinin, 0.5 ng/ml leupeptine and 0.64 mM benzamidine were added to the buffer. Cell suspensions were incubated on ice for 30 minutes, with periodic vortexing. Cell lysates were then centrifuged at 15 000xg at 4°C for 30 minutes. Supernatants were collected and subjected to Bradford assay to determine protein concentration using a bovine serum albumin standard curve. Extracted proteins were stored at -20°C until utilization.

Western blot

Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.001% (w/v) bromophenol blue) was added to each sample (50 μ g). Samples were then heated at 95°C for 5 minutes. Proteins were loaded on a 12% SDS-PAGE gel then were transferred on a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for 2 hours in a 5% powder milk-TBST solution and was subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibodies, anti-Hsc70 (dilution 1/10 000, Assay designs, ON, Canada) and anti-GAPDH (dilution 1/1000, Calbiochem, ON, Canada). GAPDH

was used as a loading control. Next day, the membrane was washed with TBST and incubated with the 5% powder milk-TBST for 10 minutes. Then, the membrane was incubated with respective horseradish peroxidase-conjugated anti-rat or anti-mouse secondary antibodies (dilution 1/2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., ON, Canada). Proteins were revealed using chemiluminescence (PerkinElmer, QC, Canada). Films were scanned and intensity of each band was quantified using ImageJ software (NIH, MD, USA).

Results

Chemical molecules reduced heat-induced keratin aggregates (Fig 15 and Fig 16)

To determine if the assayed chaperones had a beneficial effect on the keratinocytes, immunofluorescence assays evaluating keratin aggregates were conducted. Unstressed or stressed CTRL cells showed very few or no aggregates (Fig 15A and B, Fig 16A and B). Immunostaining of keratin 5 showed that in resting conditions, cytoplasmic keratin aggregates or misfolded proteins were observed in EBS6 keratinocytes (Fig 15C, Fig 16C). Transient heat-shock of the EBS6 line for 35 min led to a collapse of the keratin cytoskeleton and an increase of cytoplasmic keratin aggregates, affecting most of the cytoskeletal network (Fig 15D, Fig 16D). Pretreatment of EBS6 cells with TMAO at 150 mM or 4-PBA at 10 mM for 24h prior to heat-shock reduced the number of aggregate containing cells to 19.51% and 22.83%, respectively (Fig 15E, 16E). The reduction of 50.34% of keratin aggregates was statistically significant ($p < 0.05$, independent Student t-tests) for TMAO (Fig 15F) but the reduction of 30.12% for 4-PBA was not significant (Fig 16F). Replication assays for TMAO in EBS1 and EBS4 showed a significant reduction for EBS4 but not for EBS1 (Fig 15F).

We showed that EBS6 patient-derived mutant *KRT14* expressing cells are more vulnerable to heat-stress than control cells and that keratin abnormalities observed in EBS6 and EBS4 could be partially repaired by one of these chemical molecules suggesting its cytoprotection function.

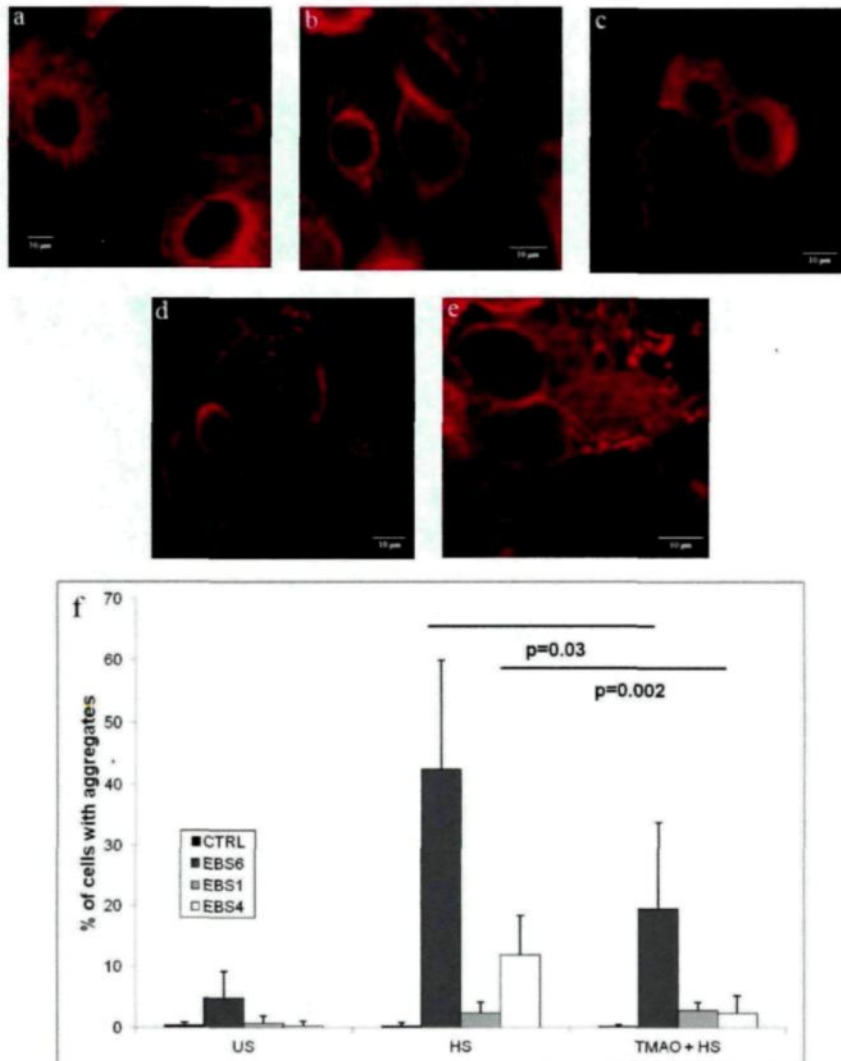


Figure 15: TMAO reduces keratin aggregates in EBS derived keratinocytes

Intermediate filaments shown in red were stained with an anti-K5 antibody in (A) unstressed or (B) heat-stressed CTRL keratinocytes, (C) unstressed or (D) heat-stressed EBS6 keratinocytes, or (E) trimethylamine N-oxide (TMAO) pretreated heat-stressed EBS6 keratinocytes. The graph (F) depicts the percentage of keratinocytes showing keratin aggregates in CTRL, EBS6, EBS1 and EBS4 unstressed (US) or heat-stressed (HS) or TMAO pretreated keratinocytes. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments (500 cells were counted for each experiment). Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

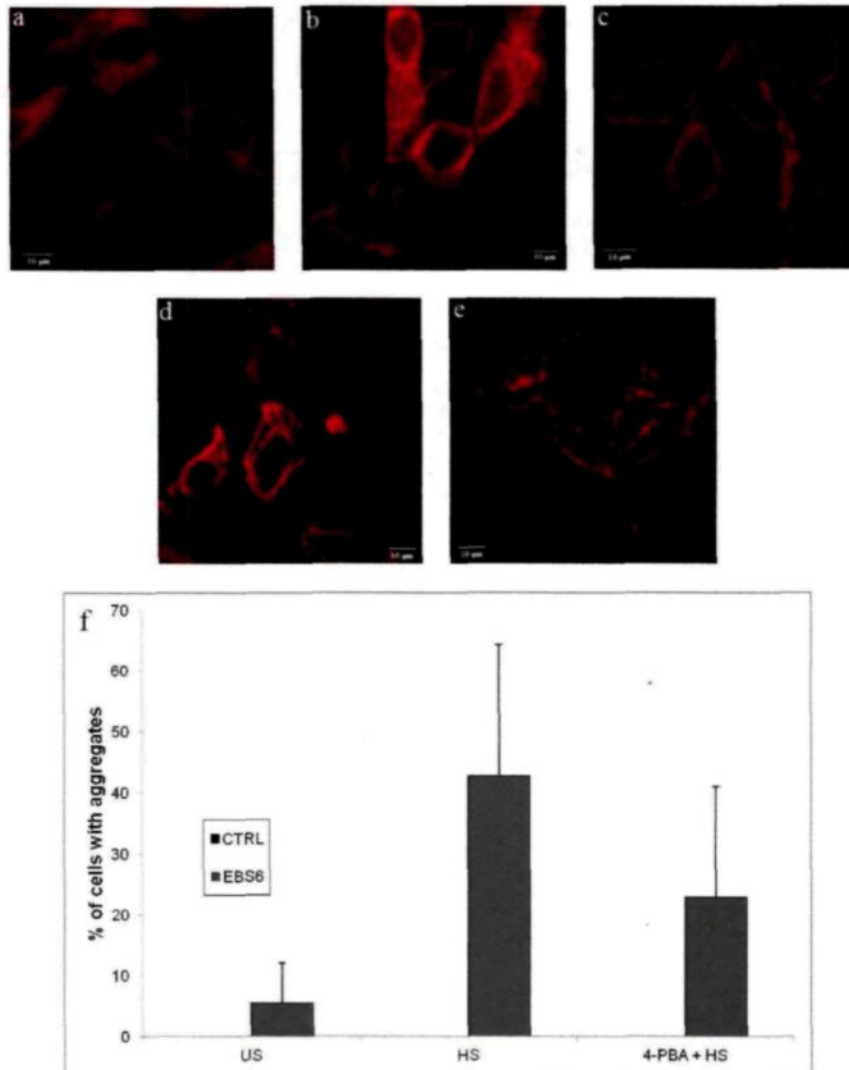


Figure 16: 4-PBA doesn't reduce keratin aggregates in EBS derived keratinocytes

Intermediate filaments shown in red were stained with an anti-K5 antibody in (A) unstressed or (B) heat-stressed CTRL keratinocytes, (C) unstressed or (D) heat-stressed EBS6 keratinocytes, or (E) sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) pretreated heat-stressed EBS keratinocytes. The graph (F) depicts the percentage of keratinocytes showing keratin aggregates in CTRL and EBS6 unstressed (US) or heat-stressed (HS) or 4-PBA pretreated keratinocytes. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments (500 cells were counted for each experiment). Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

Cytotoxicity assays showed that none of these molecules is toxic for the cells at concentrations used in this study (data not shown). At baseline, the percentage of necrosis was 36.20% for EBS6. After incubation with TMAO or 4-PBA, the necrosis was 35.44% and 36.01% respectively. A similar trend was observed for the control cell line. Without a molecule, the percentage of necrosis was 11.09% for EBS1 and 41.25% for EBS4. After a treatment with TMAO these percentages changed to 13.12% for EBS1 and 42.68% for EBS4.

KRT16 and KRT17 expression after pre-treatment (Table 2)

In addition to K14, the type I keratins, K16 and K17, share similar properties and structure (Hutton *et al.* 1998; Paladini and Coulombe 1999; Coulombe *et al.* 2004). Since these two keratins also possess an ability to polymerize with K5, it has been suggested that they could replace the mutant K14 in the heterodimer (Kerns *et al.* 2007; Coulombe *et al.* 2009). Therefore, as all our EBS lines had a mutation within *KRT14*, we analyzed the pattern of gene expression of *KRT16* and *KRT17* by quantitative real-time PCR in order to better understand the mechanical fragility arising from keratin mutations and the TMAO pre-treatment correction. We found that the magnitude of the expression of *KRT16* is slightly increased in the TMAO pre-treated EBS and the control cell lines as well as the level of *KRT17* (Table 2). Shortly, TMAO pre-treatment didn't significantly modify the pattern of expression of the *KRT16* and *KRT17* genes in human keratinocytes.

Hsc70 production after pre-treatment (Table 2)

It was demonstrated that Hsp70 protein level was increased after a pre-treatment with TMAO in a cell line with a *KRT5* mutation (Chamcheu *et al.* 2011). This protein is a chaperone and thus could help fold the mutant keratin in the correct conformation. The level of Hsc70 was therefore assessed by Western blot to determine if indeed it was modified after a pre-treatment with TMAO in the EBS6, EBS1 and EBS4 cell lines, which all have a different *KRT14*

mutation. The results obtained revealed that there was no effect of the molecule on the production of Hsc70 and that, for all the cases evaluated.

Tableau 2: TMAO doesn't modify *KRT16* and *KRT17* expression or production of Hsc70

			EBS6	EBS1	EBS4
qRT-PCR	<i>KRT16</i>	Before treatment	0.5425	5.5625	3.3025
		After treatment	0.615	7.7	5.1425
		Fold change	1.13	1.38	1.56
	<i>KRT17</i>	Before treatment	0.6	1.465	1.65
		After treatment	0.755	1.33	1.89
		Fold change	1.26	0.91	1.15
Western Blot	TMAO	Before treatment	140.38	152.05	226.43
		After treatment	123.19	142.81	172.55
		P-value	0.85	0.06	0.09
	Heat shock	Before heat shock	143.17	198.16	235.18
		After heat shock	124.76	206.18	218.27
		P-value	0.20	0.94	0.05

Quantification of *KRT16*, *KRT17* was done after a TMAO pre-treatment in the three EBS cell lines. Measurement of Hsc70 was done after a TMAO pre-treatment and a heat-shock for the keratinocytes of the three EBS cases.

Discussion

In the last years, therapeutic EBS approaches based on allele-specific strategies, including gene targeting (Petek *et al.* 2010) and trans-splicing (Wally *et al.* 2008, 2010) were evaluated but they would necessitate continuous treatment. At the protein level, a recent strategy is the addition of chemical molecules with the intent to reduce the number of mutant keratin aggregates, both in cell culture and in mouse model (Kerns *et al.* 2007, 2010; Lee *et al.*

2008; Loffek *et al.* 2010; Chamcheu *et al.* 2011). It has been shown that TMAO and 4-PBA are both efficient compounds in cytoprotection of *KRT5* mutation expressing cells and in epidermolytic ichthyosis but were not yet assayed for mutated *KRT14* cell lines (Chamcheu *et al.* 2011). We previously identified the mutation spectrum of EBS in a French Canadian collection and identified the novel R125S mutation within *KRT14* in a severely affected patient (EBS6) presenting with generalized herpetiform blistering from birth (Bchetnia *et al.* 2012). Mutations affecting the highly conserved arginine within the conserved domain at the beginning of the central α -helical rod domain of K14 (Arg125) are responsible for more than one-third of EBS Dowling-Meara cases (the most severe EBS subtype) (Li *et al.* 2007) thus supporting the need for therapy. As primary EBS keratinocytes can only be passaged a limited number of times before entering terminal differentiation and are therefore deemed suboptimal for long-term functional and therapeutic assays, we established permanent cell lines by immortalizing primary keratinocytes isolated from the EBS6 patient carrying the R125S mutation in *KRT14*, the EBS1 patient carrying the I377T mutation, the EBS4 patient carrying the I412F mutation and the non EBS control CTRL using HPV16E6E7 as transducer. Then we assayed the efficiency of two chemical molecules (TMAO and 4-PBA) in constructing, or maintaining, an effective intermediate filament cytoskeletal network in EBS6, EBS1 and EBS4 heat-stressed cell lines by examining keratin cytoskeleton. Heat-shock was applied in order to generate an ideal model, as EBS patients usually suffer from disease exacerbation in a hot and humid climate as mentioned in a review by Coulombe and Lee (2012).

Keratin aggregates are a cellular feature observed in cells containing an EBS mutation whereas they are absent in cells with a non EBS phenotype (Werner *et al.* 2004). Thus a reduction in the number of cells with aggregates is interpreted as a beneficial effect of the chaperone evaluated. Our results showed that TMAO (150 mM) and 4-PBA (10 mM) partially reduced the amounts of keratin aggregates in heat-stressed EBS cells without completely removing the misfolded proteins. For TMAO, the reduction in the number of

cells containing keratin aggregates was significant in two of the *KRT14* mutated cell lines, which is similar to what was observed by Chamcheu *et al.* in their assays with immortalized cell lines containing a *KRT5* mutation (Chamcheu *et al.* 2011a). However, we did not observe a marked diminution of the number of keratin aggregate-containing cells after a pretreatment with 4-PBA in the EBS6 cell line. That is contrary to what was seen in a study evaluating the effects of this chemical chaperone in immortalized cell lines containing a *KRT5* mutation. In this other study, the chosen dose (1 mM) was inferior to that used in our assays (10 mM) and resulted in a distinct diminution of keratin aggregate-containing cells (Chamcheu *et al.* 2011a). We thus suggest that 4-PBA isn't a putative therapeutic choice for EBS caused by a mutation in the *KRT14* gene.

Kerns *et al.* (2007) showed that treatment with the natural chemical sulforaphane ameliorates skin blistering in keratin 14 (K14)-null mice, and is correlating with the induction of K16 and K17 expression in the basal layer of epidermis which can lead to the refolding of damaged proteins. In an attempt to clarify whether TMAO is protecting human *KRT14* mutated keratin filaments by raising expression of *KRT16* and *KRT17* keratins in human keratinocytes as observed in the mouse, the mRNA levels of these two genes were measured in control and EBS6, EBS1 and EBS4 cells with or without pre-treatment with TMAO. We found no significant effect of this molecule in altering *KRT16* and *KRT17* expression either in normal or affected EBS keratinocytes. Given that these data were in contrast to the previous study in the mouse model of Kerns *et al.* (2007), we suggest that in human cells, this molecule could have another mechanism of action.

We also attempted to confirm whether the Hsp70 level was modified after a TMAO pre-treatment as shown previously in cell lines containing a *KRT5* mutation (Chamcheu *et al.* 2011a). Our results showed no significant difference in the quantity of the heat shock cognate of Hsp70, Hsc70, in all of our three *KTR14* mutant cell lines following TMAO treatment. Hsc70 is an isoform of

58

Hsp70, which has the same function in the cellular metabolism, but is expressed constitutively in the cells (Quinta *et al.* 2011). We suggest that the mechanism of action may vary according to the gene in which the mutation is located in the case of TMAO. It is also possible that the mechanism of action of TMAO involves the heat shock protein in the *KRT14* EBS subjects, but by modifying the production of another protein in the pathway such as Hsp40, the cochaperone of Hsp70 (Kampinga et Craig 2010).

We conclude that TMAO seems to be a potential therapeutic tool for EBS caused by mutations in *KRT5* and *KRT14*. A TMAO treatment could alleviate the blister formation and provide numerous new leads for investigations of pharmacological therapies of keratin-based skin disorders and other protein misfolding disorders. As the mechanisms of actions evaluated in this study were not involved, the next step would be to discover how exactly this molecule act in the cells to reduce the number of aggregates and how permanent is its effect on the keratinocytes.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their enthusiastic collaboration. This work was supported by Le Groupe Riverin Inc and by the Campagne majeure de développement de l'Université du Québec à Chicoutimi. The authors thank Claude Belleville for her invaluable help in recruiting and evaluating the subjects for the study, Anne-Marie Madore for her precious technical support, Jean Christopher Chamcheu for his help in keratinocytes culture, Dr Baki Akgul for providing us with the PT67HPV16E6E7 packaging cells and the technical staff at the Sequencing facility of the CHUL/CHUQ.

References

- Bchetnia, M., M. L. Tremblay, G. Leclerc, A. Duperee, J. Powell, C. McCuaig, C. Morin, V. Legendre-Guillemain and C. Laprise (2012). "Expression signature of epidermolysis bullosa simplex." Hum Genet **131**(3): 393-406.
- Bernot, K. M., P. A. Coulombe and P. Wong (2004). Skin: An Ideal Model System to Study Keratin Genes and Proteins. Methods in Cell Biology. M. B. Omary and A. C. Pierre, Academic Press. **Volume 78**: 453-487.
- Bolling, M. C., H. H. Lemmink, G. H. Jansen and M. F. Jonkman (2011). "Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients." Br J Dermatol **164**(3): 637-644.
- Burrows, J. A. J., L. K. Willis and D. H. Perlmutter (2000). "Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha1-antitrypsin (alpha1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha1-AT deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1796-1801.
- Chamcheu, J. C., H. Navsaria, I. Pihl-Lundin, M. Liovic, A. Vahlquist and H. Torma (2011). "Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases." J Invest Dermatol **131**(8): 1684-1691.
- Chamcheu, J. C., I. Pihl-Lundin, C. E. Mouyobo, T. Gester, M. Virtanen, A. Moustakas, H. Navsaria, A. Vahlquist and H. Torma (2011). "Immortalized keratinocytes derived from patients with epidermolytic ichthyosis reproduce the disease phenotype: a useful in vitro model for testing new treatments." Br J Dermatol **164**(2): 263-272.
- Chamcheu, J. C., M. Virtanen, P. E. Bowden, H. Navsaria, A. Vahlquist and H. Törmä (2009). "Keratin 5 mutations in Epidermolysis Bullosa Simplex: Mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide (TMAO) on heat-stressed EBS keratinocytes." J Invest Dermatol **129**(S1): S86.
- Chamcheu, J. C., M. Virtanen, H. Navsaria, P. E. Bowden, A. Vahlquist and H. Torma (2010). "Epidermolysis bullosa simplex due to KRT5 mutations: mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide in cultured primary keratinocytes." Br J Dermatol **162**(5): 980-989.
- Coulombe, P. A., M. L. Kerns and E. Fuchs (2009). "Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility." J Clin Invest **119**(7): 1784-1793.
- Coulombe, P. A. and C. H. Lee (2012). "Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath." J Invest Dermatol **132**(3 Pt 2): 763-775.
- Coulombe, P. A., X. Tong, S. Mazzalupo, Z. Wang and P. Wong (2004). "Great promises yet to be fulfilled: Defining keratin intermediate filament function in vivo." Eur J Cell Biol **83**(11-12): 735-746.
- Fujiwara, M., H. Yamamoto, T. Miyagi, T. Seki, S. Tanaka, I. Hide and N. Sakai (2013). "Effects of the Chemical Chaperone 4-Phenylbutylate on the Function of the Serotonin Transporter (SERT) Expressed in COS-7 Cells." Journal of Pharmacological Sciences.

- Gong, B., L. Y. Zhang, C. P. Pang, D. S. C. Lam and G. H. F. Yam (2009). "Trimethylamine N-oxide alleviates the severe aggregation and ER stress caused by G98R alpha A-crystallin." Mol Vis **14**: 2829-2840.
- Gu, L. H. and P. A. Coulombe (2007). "Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 13-23.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-1858.
- Hutton, E., R. D. Paladini, Q. C. Yu, M. Yen, P. A. Coulombe and E. Fuchs (1998). "Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia." J Cell Biol. **143**(2): 487-499.
- Kampinga, H. H. and E. A. Craig (2010). "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(8): 579-592.
- Kerns, M., D. DePianto, M. Yamamoto and P. A. Coulombe (2010). "Differential modulation of keratin expression by sulforaphane occurs via Nrf2-dependent and -independent pathways in skin epithelia." Mol Biol Cell **21**(23): 4068-4075.
- Kerns, M. L., D. DePianto, A. T. Dinkova-Kostova, P. Talalay and P. A. Coulombe (2007). "Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14460-14465.
- Lee, D., D. Santos, H. Al-Rawi, A. M. McNeill and E. L. Rugg (2008). "The chemical chaperone trimethylamine N-oxide ameliorates the effects of mutant keratins in cultured cells." Br J Dermatol **159**(1): 252-255.
- Li, X. L., S. X. Xiao, Z. H. Peng, Y. Liu, M. Pan and S. N. Zhou (2007). "A mutation in exon 1 of keratin 14 resulting in a Chinese family with epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara." J Eur Acad Dermatol Venereol **21**(7): 979-981.
- Loffek, S., S. Woll, J. Hohfeld, R. E. Leube, C. Has, L. Bruckner-Tuderman and T. M. Magin (2010). "The ubiquitin ligase CHIP/STUB1 targets mutant keratins for degradation." Hum Mutat **31**(4): 466-476.
- Morley, S. M., S. R. Dundas, J. L. James, T. Gupta, R. A. Brown, C. J. Sexton, H. A. Navsaria, I. M. Leigh and E. B. Lane (1995). "Temperature sensitivity of the keratin cytoskeleton and delayed spreading of keratinocyte lines derived from EBS patients." Journal of Cell Science **108**(11): 3463-3471.
- Paladini, R. D. and P. A. Coulombe (1999). "The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16." J Cell Biol. **146**(5): 1185-1201.
- Petek, L. M., P. Fleckman and D. G. Miller (2010). "Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex." Mol Ther **18**(9): 1624-1632.
- Quinta, H. R., N. M. Galigniana, A. G. Erlejman, M. Lagadari, G. Piwien-Pilipuk and M. D. Galigniana (2011). "Management of cytoskeleton architecture by molecular chaperones and immunophilins." Cell Signal **23**(12): 1907-1920.

- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: the Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells." Cell **6**(3): 331-344.
- Rubenstein, R. C. and P. L. Zeitlin (2000). "Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of delta F508-CFTR." Am J Physiol Cell Physiol **278**(2): C259-C267.
- Rugg, E. L., H. M. Horn, F. J. Smith, N. J. Wilson, A. J. Hill, G. J. Magee, C. S. Shemanko, D. U. Baty, M. J. Tidman and E. B. Lane (2007). "Epidermolysis bullosa simplex in Scotland caused by a spectrum of keratin mutations." J Invest Dermatol **127**(3): 574-580.
- Wally, V., M. Brunner, T. Lettner, M. Wagner, U. Koller, A. Trost, E. M. Murauer, S. Hainzl, H. Hintner and J. W. Bauer (2010). "K14 mRNA reprogramming for dominant epidermolysis bullosa simplex." Hum Mol Genet **19**(23): 4715-4725.
- Wally, V., A. Klausegger, U. Koller, H. Lochmuller, S. Krause, G. Wiche, L. G. Mitchell, H. Hintner and J. W. Bauer (2008). "5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene." J Invest Dermatol **128**(3): 568-574.
- Werner, N. S., R. Windoffer, P. Strnad, C. Grund, R. E. Leube and T. M. Magin (2004). "Epidermolysis bullosa simplex-type mutations alter the dynamics of the keratin cytoskeleton and reveal a contribution of actin to the transport of keratin subunits." Mol Biol Cell **15**(3): 990-1002.
- Yancey, P. H. (2005). "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses." J Exp Biol **208**(Pt 15): 2819-2830.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La peau occupe une fonction importante de protection contre les divers stress et dommages environnementaux que l'homme rencontre au quotidien. L'épidermolyse bulleuse simplex est une maladie orpheline transmise de manière autosomique dominante qui touche l'épiderme. Elle affecte l'intégrité des kératinocytes de la couche basale à la suite d'un stress, par exemple mécanique ou osmotique (D'Alessandro *et al.* 2002 ; Coulombe *et al.* 2009). Jusqu'à maintenant, il n'existe aucune thérapie efficace pour soigner l'EBS. Les caractéristiques de la maladie compliquent la tâche lorsqu'il s'agit de trouver un traitement efficace. Puisque l'épidermolyse bulleuse simplex est un trouble où les protéines sont mal repliées, l'objectif de ce travail de maîtrise était de vérifier si l'ajout des chaperonnes chimiques TMAO et 4-PBA pouvait avoir un effet bénéfique sur les kératinocytes de patients ayant une mutation dans la kératine 14.

4.1 Immunofluorescence

La première étape de l'évaluation du potentiel thérapeutique fut la vérification de la capacité de la molécule à réduire le nombre de cellules ayant des agrégats. Les cellules des patients présentent des agrégats formés des kératines mutées après avoir subi un choc, que celui-ci soit mécanique, osmotique ou thermique (Werner *et al.* 2004). Par contre, les cellules des contrôles ne présentent pas d'agrégats même après un choc (Werner *et al.* 2004). La diminution du nombre d'agrégats représentait donc un bon moyen d'évaluer si une molécule avait un effet. Quatre lignées immortalisées, soit une lignée contrôle (CTRL) et trois lignées EBS ayant une mutation différente dans la kératine 14, ont été utilisées. Ces trois patients sont EBS6, contenant la mutation 373C>A et ayant le sous-type Dowling-Meara, EBS1, avec la mutation 1130T>C et le sous type localisé, ainsi qu'EBS4, ayant la mutation 1295A>T et le sous-type localisé. La lignée EBS6 a été utilisée pour déterminer la présence

d'un effet tandis que les lignées EBS1 et EBS4 ont été prises pour confirmer la présence d'un effet potentiel.

Pour le triméthylamine N-oxyde, des réductions moyennes de 50,43% (EBS6), 9,30% (EBS1) et 83,75% (EBS4) du nombre de cellules ayant des agrégats ont été observées. Ces réductions sont significatives pour EBS6 et EBS4, ce qui indique la présence d'un effet réel du TMAO sur le nombre de cellules ayant des agrégats. Ces résultats vont dans le même sens que ce qui avait été observé par Chamcheu et ses collaborateurs lors d'essais utilisant des lignées immortalisées ayant une mutation dans le gène de la *KRT5* (Chamcheu *et al.* 2011a). Par ailleurs, il a été possible de constater que la réduction la plus marquante a été observée chez une des deux lignées ayant un phénotype moins sévère, ce qui correspond également aux résultats obtenus avec les lignées immortalisées ayant une mutation dans la *KRT5*, où une réduction maximale de 10 fois a été observée chez le patient ayant un phénotype généralisé (Chamcheu *et al.* 2011a). Un autre point à souligner est l'absence d'un effet du TMAO chez la lignée EBS1, ce qui suggère une certaine spécificité de cette chaperonne. Des études ont rapporté que pour un acide aminé situé à un certain endroit de l'hélice, la substitution par des acides aminés différents aura des répercussions distinctes sur le repliement de la protéine (Liovic *et al.* 2001 ; Smith *et al.* 2004). Le fait que les osmolytes aient des spectres d'action spécifiques et que les mutations corrigées par le TMAO soient principalement en surface de la protéine pourrait expliquer pourquoi certaines mutations sont prises en charge par rapport aux autres (Bandyopadhyay *et al.* 2012).

Cependant, pour le sodium 4-phénylbutyrate la diminution observée n'était pas significative, soit 30,12% pour la lignée EBS6. Puisque ce résultat avec la lignée EBS6 n'était pas concluant, aucun essai de réplication dans les deux autres lignées n'a été effectué. Ces résultats vont dans le sens contraire de ceux observés avec des lignées mutées en K5, où une diminution nette du

nombre de cellules contenant des agrégats a été constatée (Chamcheu *et al.* 2011a). Puisque les mutations ne sont pas situées dans le même gène, il est possible que le spectre d'action du 4-PBA soit limité à la kératine 5. Par ailleurs, l'effet bénéfique du 4-PBA a été observé jusqu'à maintenant dans le cas de protéines mal repliées qui sont coincées dans le réticulum endoplasmique (Burrows *et al.* 2000 ; Kubota *et al.* 2006 ; Datta *et al.* 2007 ; Fujiwara *et al.* 2013). Puisque dans le cas de l'EBS les protéines mal repliées sont situées dans le cytoplasme, il est possible que le 4-PBA ne puisse exercer son action sur ces dernières.

4.2 Nécrose

La seconde étape de l'évaluation du potentiel thérapeutique de ces molécules a été l'évaluation de leur toxicité pour les lignées utilisées. En effet, si une molécule est toxique pour les kératinocytes, elle devra être éliminée, et ce même si elle provoque une diminution significative du nombre de cellules ayant des agrégats. La relâche de LDH, une enzyme du cytosol, a été utilisée pour atteindre cet objectif. La relâche de cette enzyme est associée avec la nécrose cellulaire. Donc, si le taux de nécrose n'est pas significativement plus élevé après le traitement, il est possible de conclure que la molécule n'est pas toxique dans les conditions utilisées. La comparaison du pourcentage de nécrose pour chaque lignée entre la condition de base et celle après un prétraitement a permis de constater que le TMAO et le 4-PBA n'étaient pas toxiques pour la lignée EBS6. Les essais réalisés avec le TMAO ont permis de constater que cette chaperonne était également inoffensive pour les lignées EBS1 et EBS4.

4.3 Évaluation de la kératine 16 et de la kératine 17

Un des mécanismes d'action suggérés pour la sulforaphane était l'augmentation des kératines 16 et 17, deux kératines de type I qui pourraient

remplacer la kératine 14 ayant une mutation dans l'hétérodimère avec la kératine 5. La mesure de la quantité d'ARNm de ces deux kératines après un prétraitement avec le TMAO a permis de constater que le niveau d'expression de la kératine 16 ainsi que celui de la kératine 17 n'étaient pas augmentés, et ce pour les trois lignées EBS évaluées. Les expérimentations précédentes ont été effectuées chez des souris dépourvues de kératine 14 et le sulforaphane était appliqué de façon topique sur la peau des nouveaux-nés (Kerns 2007). Le fait que le modèle utilisé ainsi que la méthode de traitement soient différents peut contribuer à expliquer l'écart entre les résultats obtenus chez les kératinocytes et ceux obtenus chez la souris. De plus, les souris évaluées étaient entièrement dépourvues de kératine 14 (Kerns 2007) tandis que les lignées EBS possédaient une kératine 14 mutée. Il est donc possible que le mécanisme d'action varie selon la mutation en cause.

4.4 Évaluation de la protéine de choc thermique Hsc70

Lors de leurs expérimentations avec le TMAO, Chamcheu et ses collaborateurs ont observé qu'un prétraitement avec cette molécule entraînait une augmentation de la protéine de choc thermique Hsp70 (2011a). De plus, il est supposé que la modulation de protéines chaperonnes, tel Hsp70, peut avoir une influence au sein de troubles de repliement de protéines (Chamcheu *et al.* 2011a). Des immunobuvardages ont été effectués pour vérifier si le même mécanisme d'action était valide pour les lignées utilisées en mesurant la production d'Hsc70. Hsc70 est une isoforme d'Hsp70, a la même fonction au sein du métabolisme cellulaire et est exprimée de manière constitutive (Quinta *et al.* 2011). Pour les trois lignées, le traitement avec le TMAO n'a eu aucun effet sur la production de la protéine de choc thermique Hsc70. Les lignées de kératinocytes utilisées par Chamcheu et ses collaborateurs sont toutes les deux porteuses d'une mutation dans le gène de la kératine 5 (2009, 2011) tandis que celles qui ont été utilisées dans ce projet sont toutes porteuses d'une mutation dans le gène de la kératine 14. Il est donc possible que le mécanisme d'action varie selon la kératine touchée, ce qui pourrait expliquer qu'aucune différence

n'ait été observée pour les essais effectués avec les lignées EBS6, EBS1 et EBS4. Il est également possible que le mécanisme d'action du TMAO passe par la voie des protéines de choc thermique, mais en modifiant un autre élément de la voie. Par exemple, Hsp70 a besoin de la cochaperonne Hsp40 pour bien accomplir sa fonction et une modification de la production de cette protéine impliquerait également les chaperonnes endogènes dans le mécanisme d'action du TMAO (Kampinga et Craig 2010). Des essais sont présentement en cours afin de vérifier cette hypothèse chez les lignées EBS6, EBS1 et EBS4.

4.5 Perspectives

Pour les deux molécules à l'étude, soit le triméthylamine N-oxyde et le sodium 4-phénylbutyrate, seul le TMAO a permis d'obtenir des résultats significatifs. En effet, même s'il y avait une réduction pour les deux molécules dans le nombre de cellules ayant des agrégats seule celle observée pour le TMAO était significative pour la lignée EBS6. En ce qui concerne le TMAO, cette diminution a été répliquée dans une lignée ayant un phénotype moins sévère (EBS4). Les résultats obtenus démontrent que cette molécule pourrait s'avérer une piste thérapeutique potentielle. Cependant, il faut tout d'abord déterminer le spectre d'action de ce composé, c'est-à-dire sur quelles lignées ou encore dans le cas de quelle mutation il a un effet. Par la suite, une analyse pourrait permettre de déterminer si un point commun les unit. S'il en existe un, il serait possible de l'utiliser comme point de départ pour déterminer le mécanisme d'action de cette molécule.

Un autre point à considérer est le modèle d'étude utilisé pour évaluer les effets des agents pharmaceutiques. En effet, il est probable qu'un effet bénéfique observé chez un modèle cellulaire ne le soit pas dans un modèle animal et vice-versa. Un exemple de ce cas est la sulforaphane. Une étude réalisée chez des souris EBS n'ayant pas de kératine 14, où la sulforaphane

était appliquée de manière topique, a permis de constater un effet bénéfique de cette molécule (Kerns *et al.* 2007). Cependant, lors d'essais réalisés avec la lignée immortalisée EBS6, aucun effet de la sulforaphane n'a été constaté sur le nombre de cellules contenant des agrégats après un prétraitement et un choc thermique (laboratoire dirigé par Catherine Laprise, 2012). Il sera donc nécessaire d'évaluer le TMAO au sein d'autres modèles afin de confirmer l'effet observé chez les lignées immortalisées. Un premier pas dans cette direction serait d'utiliser des lignées primaires. Cela a déjà été réalisé pour deux individus ayant une mutation dans la kératine 5 et les résultats obtenus étaient semblables pour les lignées primaires et les lignées immortalisées (Chamcheu *et al.* 2010 ; Chamcheu *et al.* 2011a). Par ailleurs, il ne faut pas perdre de vue que bien qu'ils ne soient observés que chez les personnes EBS, les agrégats ne sont peut-être pas le meilleur moyen d'évaluer un effet et ne sont peut-être qu'un phénomène secondaire (Chamcheu *et al.* 2011a). Il est possible que les agrégats ne soient brisés que pour une courte période et qu'ils se reforment ensuite ou encore que leur «disparition» ne signifie pas nécessairement que les deux kératines (type I et II) puissent à nouveau former des dimères. Bref, la disparition des agrégats n'est pas la preuve définitive d'une résolution du problème. Idéalement, il serait nécessaire d'évaluer les molécules ayant un effet dans un modèle autre que le modèle cellulaire actuel, dans un modèle animal par exemple, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la diminution du nombre d'agrégats et un réel effet bénéfique de la molécule. Par exemple, si pour deux composés une diminution significative du nombre d'agrégats a été observée, mais qu'un seul des deux a un effet bénéfique dans un modèle animal, cela met en doute l'hypothèse que la réduction des agrégats est un bon moyen pour observer un effet thérapeutique potentiel. Cependant, tant qu'un autre moyen d'évaluer les effets qui serait plus rapide et plus fiable ne sera pas découvert, il faudra conserver celui-ci puisque les agrégats sont une caractéristique mesurable propre aux patients EBS. C'est pourquoi il est important d'entreprendre des recherches permettant d'évaluer les changements phénotypiques, moléculaires ou cellulaires répertoriés chez les personnes atteintes d'EBS afin de trouver un autre moyen de mesurer l'effet thérapeutique

potentiel d'un composé ou de confirmer hors de tout doute que celui utilisé présentement est fiable pour l'ensemble des mutations EBS.

Par ailleurs, des expériences réalisées chez la levure ont permis de démontrer que le TMAO était capable de tamponner les effets de certaines mutations (Bandyopadhyay *et al.* 2012). De plus, il a également été constaté que pour une banque de variants d'une même protéine, le spectre de mutation tamponnées était différent selon la chaperonne chimique évaluée (Bandyopadhyay *et al.* 2012). Par ailleurs, les méthylamines, la famille d'osmolytes dont fait partie le TMAO, sont connues pour augmenter la stabilité des protéines (Yancey et Somero 1979 ; Santoro *et al.* 1992 ; Bolen 2004). La sarcosine et le triméthylglycine, les autres membres de la famille méthylamine, ont un effet modéré dans la stabilisation de protéines (Yancey et Somero 1979). Il a également été observé qu'elle pouvait faciliter la renaturation d'une protéine qui avait été dénaturée par l'acide (Yancey et Somero 1979). Évaluer si ces deux molécules ont un effet bénéfique dans l'EBS et, le cas échéant, déterminer le spectre de mutations tamponnées, pourrait être une voie à explorer.

Une autre solution afin de trouver une thérapie pour l'EBS serait d'évaluer d'autres agents pharmaceutiques. En effet, des expérimentations utilisant d'autres chaperonnes chimiques dans un contexte de correction de protéines mal repliées ont été effectuées. Le tréhalose, une chaperonne faisant partie de la famille des osmolytes, est un disaccharide retrouvé naturellement chez plusieurs espèces animales (Singer et Lindquist 1998 ; Chen et Haddad 2004). Il a été démontré que chez la levure, cette molécule serait capable d'éliminer l'agrégation et de stabiliser les protéines lors d'un choc thermique (Singer et Lindquist 1998). De plus, cette chaperonne a été étudiée dans le contexte de la maladie de Huntington où elle allégerait les symptômes d'un modèle murin (Davies *et al.* 2006). Le tréhalose a réduit la toxicité causée par la protéine mutante et a inhibé la formation d'agrégats en se liant et en stabilisant

les protéines mal repliées (Davies *et al.* 2006). L'acide tauroursodéoxycholique (TUDCA) est un acide de la bile présent à de faibles concentrations chez l'humain (Hua *et al.* 2010). Cette chaperonne peut atténuer le stress du réticulum endoplasmique provoqué par la tunicamycine chez les macrophages (Hua *et al.* 2010). Elle est également capable de stabiliser la protéine HFE contenant la mutation C282Y (de Almeida *et al.* 2007). Cependant l'action de cette molécule se situe surtout au niveau de l'apoptose. Effectivement, elle a un effet anti-apoptotique dans certaines maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Rodrigues *et al.* 2000 ; Duan *et al.* 2002 ; Ramalho *et al.* 2004).

Une possibilité d'avenir afin d'identifier un agent pharmaceutique bénéfique dans le contexte de l'EBS est le criblage à haut débit. Le criblage à haut débit est une méthode qui utilise le criblage d'une collection entière de petites molécules contre une cible thérapeutique purifiée ou dans un système d'essai plus complexe (Fox *et al.* 2006). Cette technique a pour objectif d'identifier des molécules qui sont à la fois efficaces et spécifiques contre une cible d'intérêt et permet une évaluation automatisée et simultanée de dizaines de milliers de composés (Varma *et al.* 2008 ; Jacobson *et al.* 2010). L'objectif d'un tel criblage consiste à développer une des molécules identifiées jusqu'à l'obtention d'un médicament. Il serait donc possible en utilisant cette méthode de découvrir de nouveaux composés ou des familles de composés capables d'avoir un effet bénéfique dans le cadre d'EBS. Toutefois, le criblage à haut débit comporte des inconvénients à ne pas négliger. Un de ces désavantages est l'investissement élevé qu'il nécessite. Ces coûts incluent à la fois tous les appareils nécessaires à son accomplissement et leur manipulation, comme les robots manipulant les plaques ou les appareils de mesure comme le microscope et les coûts liés à la banque de composés et au maintien des cellules par exemple. Plus les réactifs biologiques à utiliser sont sensibles, chers ou difficiles à produire ou encore plus la technologie d'analyse est dispendieuse plus désavantageuse devient l'idée d'effectuer un criblage (Mayr et Bojanic 2009). Par exemple, dans le cas de l'EBS, l'essai cellulaire utilisé au

laboratoire nécessite un choc thermique et l'utilisation d'immunofluorescence. Cela veut donc dire un investissement élevé en raison des nombreuses conditions d'un essai (avec ou sans prétraitement, avec ou sans choc thermique), de l'usage de nombreux réactifs utilisés pour maintenir en culture une grande quantité de cellules et de l'utilisation d'anticorps à grande échelle. Un autre inconvénient majeur du criblage à haut débit est son taux de succès peu élevé. En effet, la proportion de composés identifiée par un criblage primaire demeure très faible, de l'ordre de 1-2% (Slater 2001). Cela sous-entend que plus on veut augmenter les chances de découvrir une piste, plus la taille de la collection de composés à analyser doit augmenter et plus les coûts totaux de l'essai vont augmenter. Par ailleurs, dans le cas de l'EBS la réalisation d'un essai en utilisant les conditions actuelles amènent un autre inconvénient, le temps nécessaire avant d'obtenir un résultat. Le criblage à haut débit a pour objectif d'identifier des molécules qui sont à la fois efficaces et spécifiques contre une cible d'intérêt et permet une évaluation automatisée et simultanée de dizaines de milliers de composés (Varma *et al.* 2008 ; Jacobson *et al.* 2010). On peut donc déduire que l'objectif d'une telle méthode est d'obtenir rapidement un résultat. Or ce n'est pas ce qui se produirait si on effectuait un criblage à haut débit pour les patients EBS avec l'essai actuellement en cours au laboratoire. Tout d'abord, les kératinocytes n'ont pas un rythme de croissance très élevé, ce qui augmente la durée de temps nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante de cellules pour procéder à un essai. Ensuite, il faut patienter pour le temps du prétraitement avec la collection de composés. Par la suite, il faut procéder au choc thermique et à l'immunofluorescence, des étapes nécessitant des temps d'attente pour entre autres la fixation des anticorps. Finalement, il faut procéder aux comptes cellulaires pour toutes les conditions de l'essai, à 500 cellules pour chaque condition. Au final, le temps demandé pour un résultat est long et ce sans compter les criblages secondaires visant à confirmer la présence d'un effet. Donc, les caractéristiques de l'essai actuel font en sorte qu'il est difficilement transposable en un format permettant d'effectuer un criblage à haut débit. Puisque le *readout* est un élément crucial de la technique de criblage à haut débit, l'indisponibilité d'un essai cellulaire possédant un *readout* fiable et

facilement mesurable empêche pour le moment l'utilisation de cette méthode chez les individus EBS. En résumé, bien qu'il ne soit pas accessible dans l'immédiat, le criblage à haut débit demeure une avenue possible pour l'identification des voies thérapeutiques potentielles.

Une piste de thérapie génique envisageable dans le contexte de l'EBS serait l'utilisation de molécules de clivage, c'est-à-dire les *zinc finger nucleases* (ZFN) ou les *Transcription Activator-Like Effector* (TALE) *Nucleases* (TALEN). En effet, ces enzymes sont capables de reconnaître et de se lier à un site unique ou rare de l'ADN (Sung *et al.* 2012). Cela signifie qu'il serait possible de concevoir un ZFN ou un TALEN apte à reconnaître chaque mutation recensée chez des patients EBS. Un autre atout de ces méthodes est leur faible toxicité (Collin et Lako 2011). Cela constitue un point en faveur de leur utilisation dans l'EBS, puisque les cellules de patients sont difficiles à obtenir pour effectuer des expérimentations.

Plusieurs options sont envisageables pour l'utilisation de molécules de clivage dans l'EBS. Tout d'abord, il serait possible d'utiliser les ZFN pour introduire un ADN donneur ne contenant pas de mutation dans les cellules de patients EBS. Ainsi la kératine touchée serait remplacée par une kératine normale qui serait exprimée à sa place. Cependant, ce modèle possède certaines limites. Tout d'abord, le fait qu'il existe plusieurs centaines de mutations recensées signifie que l'expérience est à recommencer pour chaque patient (Coulombe et Lee 2012). Cela implique donc de créer des bouts d'ADN donneur propres à chaque individu atteint d'EBS, puis ensuite d'intégrer ce dernier dans les cellules de patients par exemple. Un autre inconvénient de ce modèle est la régénération des kératinocytes. En effet, les kératinocytes responsables de l'EBS sont situés à la couche basale de l'épiderme et se déplacent vers l'extérieur de l'épiderme au fil de leur différenciation (Roberts et Brunt 1986 ; Uitto et Richard 2005 ; Chamcheu *et al.* 2009). Cela implique donc un renouvellement constant du traitement pour un effet à long terme.

En supposant que comme l'avait démontré Chamcheu, la protéine Hsp70 est augmentée par un traitement au TMAO et que cela a un effet bénéfique pour les cellules de patients, une autre option serait d'utiliser les molécules de clivage pour modifier Hsp70 (Chamcheu *et al.* 2011a). Par exemple, cela pourrait être effectué via l'introduction d'un promoteur facilitant la surexpression du gène à proximité d'Hsp70. La chaperonne ainsi surexprimée pourrait aider au repliement des kératines mutées des personnes atteintes d'EBS, les rendant éventuellement moins vulnérables au stress. Par ailleurs, le problème du renouvellement des kératinocytes et de l'efficacité à long terme se pose également avec cette option.

Une autre alternative faisant appel aux ZFN ou aux TALEN serait l'utilisation de cellules souches (Collin et Lako 2011). Puisque l'EBS est une maladie génétique dont le gène responsable est connu, l'utilisation de ZFN et de *human induced-pluripotent stem cells* (hiPSCs) est théoriquement possible. Les hiPSC issues de patients seraient traitées avec les ZFN pour insérer une kératine sans mutation (Collin et Lako 2011). Par la suite, le clone contenant cette kératine sauvage serait suivi jusqu'à sa différenciation en kératinocytes, lesquels seraient mis en culture en vue d'une transplantation chez le patient (Collin et Lako 2011). Un obstacle à cette alternative est la présence de nombreuses mutations EBS requérant de recommencer pour chaque patient (Coulombe et Lee 2012).

CONCLUSION

Jusqu'à maintenant, il n'existe aucune thérapie efficace à long terme pour traiter l'épidermolyse bulleuse simplex. Les caractéristiques de la maladie compliquent la tâche des chercheurs qui s'y consacrent. Cependant, des équipes à travers le monde continuent d'effectuer des recherches afin de trouver un remède qui permettra d'améliorer efficacement la qualité de vie des gens atteints. Plusieurs angles ont été abordés, soit des thérapies utilisant l'ADN, l'ARN, les protéines ou encore l'ajout de molécules à potentiel thérapeutique.

Les expérimentations réalisées au sein de ce mémoire auront permis de démontrer que la chaperonne chimique TMAO a eu un effet bénéfique sur le nombre d'agrégats de cellules de patients EBS ayant une mutation dans la kératine 14. La suite logique de ces travaux serait de documenter le mécanisme d'action de l'osmolyte TMAO puisqu'il s'avère une avenue thérapeutique potentielle pour l'EBS.

BIBLIOGRAPHIE

- Abitbol, R. J. and L. H. Zhou (2009). "Treatment of epidermolysis bullosa simplex Weber-Cockayne type, with Botulinum Toxin type A." Arch Dermatol **145**(1): 13-15.
- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2010). Essential Cell Biology, Third Edition. New York, USA, Garland Science.
- Angelidis, C. E., I. Lazaridis and G. N. Pagoulatos (1999). "Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms." Eur J Biochem **259**(1-2): 505-512.
- Arin, M. J. (2009). "The molecular basis of human keratin disorders." Hum Genet **125**(4): 355-373.
- Aumailley, M., C. Has, L. Tunggal and L. Bruckner-Tuderman (2006). "Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications." Expert Rev Mol Med **8**(24): 1-21.
- Bae, K. H., Y. D. Kwon, H. C. Shin, M. S. Hwang, E. H. Ryu, K. S. Park, H. Y. Yang, D. K. Lee, Y. Lee, J. Park, H. S. Kwon, H. W. Kim, B. I. Yeh, H. W. Lee, S. H. Sohn, J. Yoon, W. Seol and J. S. Kim (2003). "Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors." Nat Biotechnol **21**(3): 275-280.
- Bakan, A., J. S. Lazo, P. Wipf, K. M. Brummond and I. Bahar (2008). "Toward a Molecular Understanding of the Interaction of Dual Specificity Phosphatases with Substrates: Insights from Structure-Based Modeling and High Throughput Screening." Curr Med Chem **15**(25): 2536-2544.
- Bandyopadhyay, A., K. Saxena, N. Kasturia, V. Dalal, N. Bhatt, A. Rajkumar, S. Maity, S. Sengupta and K. Chakraborty (2012). "Chemical chaperones assist intracellular folding to buffer mutational variations." Nat Chem Biol **8**(3): 238-245.
- Batta, K., E. L. Rugg, N. J. Wilson, N. West, H. Goodyear, E. B. Lane, M. Gratian, P. Dopping-Hepenstal, C. Moss and R. A. Eady (2000). "A keratin 14 'knockout' mutation in recessive epidermolysis bullosa simplex resulting in less severe disease." Br J Dermatol **143**(3): 621-627.
- Bchetnia, M., M. L. Tremblay, G. Leclerc, A. Duperee, J. Powell, C. McCuaig, C. Morin, V. Legendre-Guillemain and C. Laprise (2012). "Expression signature of epidermolysis bullosa simplex." Hum Genet **131**(3): 393-406.
- Beissinger, M. and J. Buchner (1998). "How chaperones fold proteins." Biol Chem **379**(3): 245-259.
- Bennion, B. J., M. L. DeMarco and V. Daggett (2004). "Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide." Biochemistry **43**(41): 12955-12963.
- Bergman, R. (1999). "Immunohistopathologic diagnosis of epidermolysis bullosa." Am J Dermatopathol **21**(2): 185-192.
- Bergoglio, V., E. Warrick, O. Chevallier-Lagente and T. Magnaldo (2008). "Cutaneous gene therapy: the graft takes." Med Sci (Paris) **24**(6-7): 607-614.

- Bernot, K. M., P. A. Coulombe and P. Wong (2004). Skin: An Ideal Model System to Study Keratin Genes and Proteins. Methods in Cell Biology. M. B. Omary and A. C. Pierre, Academic Press. **Volume 78**: 453-487.
- Bibikova, M., K. Beumer, J. K. Trautman and D. Carroll (2003). "Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases." Science **300**(5620): 764.
- Bibikova, M., D. Carroll, D. J. Segal, J. K. Trautman, J. Smith, Y. G. Kim and S. Chandrasegaran (2001). "Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases." Mol Cell Biol **21**(1): 289-297.
- Bibikova, M., M. Golic, K. G. Golic and D. Carroll (2002). "Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases." Genetics **161**(3): 1169-1175.
- Bitinaite, J., D. A. Wah, A. K. Aggarwal and I. Schildkraut (1998). "FokI dimerization is required for DNA cleavage." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10570-10575.
- Blacksin, M. F., D. H. Ha, M. Hameed and S. Aisner (2006). "Superficial soft-tissue masses of the extremities." Radiographics **26**(5): 1289-1304.
- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt and U. Bonas (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science **326**(5959): 1509-1512.
- Bolen, D. W. (2004). "Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization." Methods **34**(3): 312-322.
- Bolling, M. C., H. H. Lemmink, G. H. Jansen and M. F. Jonkman (2011). "Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients." Br J Dermatol **164**(3): 637-644.
- Bonnetblanc, J. M. and J. J. Bouquier (1986). "Response to pipamperone in case of epidermolysis bullosa herpetiformis." The Lancet **327**(8493): 1327-1328.
- Brogden, N. K., L. Mehalick, C. L. Fischer, P. W. Wertz and K. A. Brogden (2012). "The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation." Skin Pharmacol Physiol **25**(4): 167-181.
- Brown, C. R., L. Q. Hong-Brown, J. Biwersi, A. S. Verkman and W. J. Welch (1996). "Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein." Cell Stress Chaperon **1**(2): 117-125.
- Bruckner-Tuderman, L. (1994). "Epidermolysis bullosa: pathogenetic pathways from mutations to symptoms." Ann Med **26**(3): 165-171.
- Brusilow, S. W. (1991). "Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion." Pediatr Res **29**(2): 147-150.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-366.
- Bukau, B., J. Weissman and A. Horwich (2006). "Molecular chaperones and protein quality control." Cell **125**(3): 443-451.
- Burrows, J. A. J., L. K. Willis and D. H. Perlmutter (2000). "Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha1-antitrypsin (alpha1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver

- injury and emphysema in alpha1-AT deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1796-1801.
- Cao, T., M. A. Longley, X. J. Wang and D. R. Roop (2001). "An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex." J Cell Biol. **152**(3): 651-656.
- Carducci, M. A., J. B. Nelson, K. M. Chan-Tack, S. R. Ayyagari, W. H. Sweatt, P. A. Campbell, W. G. Nelson and J. W. Simons (1996). "Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate." Clin Cancer Res **2**(2): 379-387.
- Carlile, G. W., R. Robert, D. Zhang, K. A. Teske, Y. Luo, J. W. Hanrahan and D. Y. Thomas (2007). "Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay." Chembiochem **8**(9): 1012-1020.
- Carlson, D. F., W. Tan, S. G. Lillico, D. Stverakova, C. Proudfoot, M. Christian, D. F. Voytas, C. R. Long, C. B. Whitelaw and S. C. Fahrenkrug (2012). "Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(43): 17382-17387.
- Celinski, S. A. and J. M. Scholtz (2002). "Osmolyte effects on helix formation in peptides and the stability of coiled-coils." Protein Sci **11**(8): 2048-2051.
- Chamcheu, J. C., E. P. Lorie, B. Akgul, E. Bannbers, M. Virtanen, L. Gammon, A. Moustakas, H. Navsaria, A. Vahlquist and H. Torma (2009). "Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition." J Dermatol Sci **53**(3): 198-206.
- Chamcheu, J. C., H. Navsaria, I. Pihl-Lundin, M. Liovic, A. Vahlquist and H. Torma (2011). "Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases." J Invest Dermatol **131**(8): 1684-1691.
- Chamcheu, J. C., I. Pihl-Lundin, C. E. Mouyobo, T. Gester, M. Virtanen, A. Moustakas, H. Navsaria, A. Vahlquist and H. Torma (2011). "Immortalized keratinocytes derived from patients with epidermolytic ichthyosis reproduce the disease phenotype: a useful in vitro model for testing new treatments." Br J Dermatol **164**(2): 263-272.
- Chamcheu, J. C., I. A. Siddiqui, D. N. Syed, V. M. Adhami, M. Liovic and H. Mukhtar (2011). "Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages." Arch Biochem Biophys **508**(2): 123-137.
- Chamcheu, J. C., M. Virtanen, P. E. Bowden, H. Navsaria, A. Vahlquist and H. Törmä (2009). "Keratin 5 mutations in Epidermolysis Bullosa Simplex: Mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide (TMAO) on heat-stressed EBS keratinocytes." J Invest Dermatol **129**(S1): S86.
- Chamcheu, J. C., M. Virtanen, H. Navsaria, P. E. Bowden, A. Vahlquist and H. Torma (2010). "Epidermolysis bullosa simplex due to KRT5 mutations: mutation-related differences in cellular fragility and the protective effects of trimethylamine N-oxide in cultured primary keratinocytes." Br J Dermatol **162**(5): 980-989.
- Chan, Y., I. Anton-Lamprecht, Q. C. Yu, A. Jackel, B. Zabel, J. P. Ernst and E. Fuchs (1994). "A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads

- to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein." Genes & Development **8**(21): 2574-2587.
- Chang, K. T. and K. T. Min (2002). "Regulation of lifespan by histone deacetylase." Ageing Res Rev **1**(3): 313-326.
- Chaudhuri, T. K. and S. Paul (2006). "Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches." FEBS J **273**(7): 1331-1349.
- Chen, B., M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C. W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen and L. Lum (2009). "Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer." Nat Chem Biol **5**(2): 100-107.
- Chen, Q. and G. G. Haddad (2004). "Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals." J Exp Biol **207**(18): 3125-3129.
- Choo, Y. and A. Klug (1994). "Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11163-11167.
- Ciubotaru, D., R. Bergman, D. Baty, M. Indelman, E. Pfendner, D. Petronius, H. Moualem, M. Kanaan, D. B. Amitai, W. H. McLean, J. Uitto and E. Sprecher (2003). "Epidermolysis Bullosa Simplex in Israel : Clinical and Genetic Features." Arch Dermatol **139**(4): 498-505.
- Collin, J. and M. Lako (2011). "Concise review: putting a finger on stem cell biology: zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells." Stem Cells **29**(7): 1021-1033.
- Cornu, T. I., S. Thibodeau-Beganny, E. Guhl, S. Alwin, M. Eichtinger, J. K. Joung and T. Cathomen (2008). "DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases." Mol Ther **16**(2): 352-358.
- Coulombe, P. A., M. L. Kerns and E. Fuchs (2009). "Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility." J Clin Invest **119**(7): 1784-1793.
- Coulombe, P. A. and C. H. Lee (2012). "Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath." J Invest Dermatol **132**(3 Pt 2): 763-775.
- Coulombe, P. A., X. Tong, S. Mazzalupo, Z. Wang and P. Wong (2004). "Great promises yet to be fulfilled: Defining keratin intermediate filament function in vivo." Eur J Cell Biol **83**(11-12): 735-746.
- Crowe, J. H. (2007). "Trehalose as a 'chemical chaperone': fact and fantasy." Adv Exp Med Biol **594**: 143-158.
- Cummins, R. E., S. Klingberg, J. Wesley, M. Rogers, Y. Zhao and D. F. Murrell (2001). "Keratin 14 point mutations at codon 119 of helix 1A resulting in different epidermolysis bullosa simplex phenotypes." J Invest Dermatol **117**(5): 1103-1107.
- D'Alessandro, M., D. Russel, S. M. Morley, A. M. Davies and E. B. Lane (2002). "Keratin mutations of epidermolysis bullosa simplex alter the kinetics of stress response to osmotic shock." J Cell Sci **115**(22): 4341-4351.
- Dallinger, G., M. Puttaraju, L. G. Mitchell, K. B. Yancey, C. Yee, A. Klausegger, H. Hintner and J. W. Bauer (2003). "Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMArt) for the correction of inherited skin diseases." Exp Dermatol **12**(1): 37-46.

- Datta, R., A. Waheed, G. N. Shah and W. S. Sly (2007). "Signal sequence mutation in autosomal dominant form of hypoparathyroidism induces apoptosis that is corrected by a chemical chaperone." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19989-19994.
- Davies, J. E., S. Sarkar and D. C. Rubinsztein (2006). "Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy." Hum Mol Genet **15**(1): 23-31.
- de Almeida, S. F., G. Picarote, J. V. Fleming, M. Carmo-Fonseca, J. E. Azevedo and M. de Sousa (2007). "Chemical chaperones reduce endoplasmic reticulum stress and prevent mutant HFE aggregate formation." J Biol Chem **282**(38): 27905-27912.
- Deng, W., P. Yuan, W. Lai, M. Chen, Y. Wang and S. Dai (2011). "A novel KRT5 mutation, p.Lys199Asn, is associated with three subtypes of epidermolysis bullosa simplex phenotypes in a single Chinese family." J Dermatol Sci **64**(3): 241-243.
- Duan, W. M., C. M. Rodrigues, L. R. Zhao, C. J. Steer and W. C. Low (2002). "Tauroursodeoxycholic acid improves the survival and function of nigral transplants in a rat model of Parkinson's disease." Cell Transplant **11**(3): 195-205.
- Echeverria-Garcia, B., A. Vicente, A. Hernandez, J. M. Mascaro, I. Colmenero, A. Terron, M. J. Escamez, M. Del Rio, M. A. Gonzalez-Ensenat and A. Torrelo (2012). "Epidermolysis Bullosa Simplex with Mottled Pigmentation: A Family Report and Review." Pediatr Dermatol.
- Eichner, R., T. T. Sun and U. Aebi (1986). "The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments." J Cell Biol **102**(5): 1767-1777.
- Elias, P. M. (1983). "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation." J Invest Dermatol **80**(Suppl): 44s-49s.
- Etzion, Y. and A. J. Muslin (2009). "The Application of Phenotypic High-Throughput Screening Techniques to Cardiovascular Research." Trends Cardiovasc Med **19**(6): 207-212.
- Ferrari, S., G. Pellegrini, T. Matsui, F. Mavilio and M. De Luca (2006). "Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa." Expert Opin. Biol. Ther. **6**(4): 367-378.
- Fine, J. D., E. A. Bauer, R. A. Briggaman, D. M. Carter, R. A. Eady, N. B. Esterly, K. A. Holbrook, S. Hurwitz, L. Johnson, A. Lin, R. Pearson and V. P. Sybert (1991). "Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa." J Am Acad Dermatol **24**(1): 119-135.
- Fine, J. D., R. A. Eady, E. A. Bauer, J. W. Bauer, L. Bruckner-Tuderman, A. Heagerty, H. Hintner, A. Hovnanian, M. F. Jonkman, I. Leigh, J. A. McGrath, J. E. Mellerio, D. F. Murrell, H. Shimizu, J. Uitto, A. Vahlquist, D. Woodley and G. Zambruno (2008). "The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB." J Am Acad Dermatol **58**(6): 931-950.
- Fine, J. D. and L. Johnson (1988). "Evaluation of the efficacy of topical bufexamac in epidermolysis bullosa simplex : A double-blind placebo-controlled crossover trial." Arch Dermatol **124**(11): 1669-1672.
- Fischer, H., N. Fukuda, P. Barbry, B. Illek, C. Sartori and M. A. Matthay (2001). "Partial restauration of defective chloride conductance in DeltaF508 mice

- by trimethylamine oxide." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(1): L52-L57.
- Fivenson, D. P., L. Scherschun, M. Choucair, D. Kukuruga, J. Young and T. Shwayder (2003). "Graftskin therapy in epidermolysis bullosa." J Am Acad Dermatol **48**(6): 886-892.
- Fox, S., S. Farr-Jones, L. Sopchak, A. Boggs, H. W. Nicely, R. Khoury and M. Biros (2006). "High-throughput screening: update on practices and success." J Biomol Screen **11**(7): 864-869.
- Fujiwara, M., H. Yamamoto, T. Miyagi, T. Seki, S. Tanaka, I. Hide and N. Sakai (2013). "Effects of the Chemical Chaperone 4-Phenylbutylate on the Function of the Serotonin Transporter (SERT) Expressed in COS-7 Cells." Journal of Pharmacological Sciences.
- Gavrilov, K. and W. M. Saltzman (2012). "Therapeutic siRNA: principles, challenges and strategies." Yale J Biol Med **85**(2): 187-200.
- Gebauer, M., M. Zeiner and U. Gehring (1997). "Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects refolding activity." FEBS Lett **417**(1): 109-113.
- Giacomotto, J. and L. Segalat (2010). "High-throughput screening and small animal models, where are we?" Br J Pharmacol **160**(2): 204-216.
- Girolomoni, G., C. Caux, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant and P. Ricciardi-Castagnoli (2002). "Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells." Trends Immunol **23**(1): 6-8.
- Gong, B., L. Y. Zhang, C. P. Pang, D. S. C. Lam and G. H. F. Yam (2009). "Trimethylamine N-oxide alleviates the severe aggregation and ER stress caused by G98R alpha A-crystallin." Mol Vis **14**: 2829-2840.
- Grayson, D. R., M. Kundakovic and R. P. Sharma (2010). "Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders?" Mol Pharmacol **77**(2): 126-135.
- Gu, L. H. and P. A. Coulombe (2007). "Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 13-23.
- Halaban, R., S. H. Pomerantz, S. Marshall, D. T. Lambert and A. B. Lerner (1983). "Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture." J Cell Biol **97**(2): 480-488.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-1858.
- Haslbeck, M., T. Franzmann, D. Weinfurter and J. Buchner (2005). "Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins." Nat Struct Mol Biol **12**(10): 842-846.
- Hatzfeld, M. and W. W. Franke (1985). "Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides." J Cell Biol **101**(5 Pt 1): 1826-1841.
- Hengge, U. R. (2008). "SMaRT technology enables gene expression repair in skin gene therapy." J Invest Dermatol **128**(3): 499-500.
- Hickerson, R. P., S. A. Leachman, L. N. Pho, E. Gonzalez-Gonzalez, F. J. Smith, W. H. McLean, C. H. Contag, D. Leake, L. M. Milstone and R. L.

- Kaspar (2011). "Development of quantitative molecular clinical end points for siRNA clinical trials." J Invest Dermatol **131**(5): 1029-1036.
- Hockemeyer, D., F. Soldner, C. Beard, Q. Gao, M. Mitalipova, R. C. DeKolver, G. E. Katibah, R. Amora, E. A. Boydston, B. Zeitler, X. Meng, J. C. Miller, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov and R. Jaenisch (2009). "Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases." Nat Biotechnol **27**(9): 851-857.
- Howard, M., H. Fischer, J. Roux, B. C. Santos, S. R. Gullans, P. H. Yancey and W. J. Welch (2003). "Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function." J Biol Chem **278**(37): 35159-35167.
- Hua, Y., M. R. Kandadi, M. Zhu, J. Ren and N. Sreejayan (2010). "Tauroursodeoxycholic acid attenuates lipid accumulation in endoplasmic reticulum-stressed macrophages." J Cardiovasc Pharmacol **55**(1): 49-55.
- Huang, P., A. Xiao, M. Zhou, Z. Zhu, S. Lin and B. Zhang (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 699-700.
- Huang, S. M., Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. A. Michaud, O. Charlat, E. Wiellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C. J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M. Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegl, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M. W. Kirschner, C. Lengauer, P. M. Finan, J. A. Tallarico, T. Bouwmeester, J. A. Porter, A. Bauer and F. Cong (2009). "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling." Nature **461**(7264): 614-620.
- Hutton, E., R. D. Paladini, Q. C. Yu, M. Yen, P. A. Coulombe and E. Fuchs (1998). "Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia." J Cell Biol **143**(2): 487-499.
- Iannitti, T. and B. Palmieri (2011). "Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate." Drugs R D **11**(3): 227-249.
- Intong, L. R. and D. F. Murrell (2012). "Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification." Clin Dermatol **30**(1): 70-77.
- Irvine, A. D. and W. H. I. McLean (1999). "Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation." Br J Dermatol **140**(5): 815-828.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.
- Jacobson, E. M., E. R. Hugo, T. R. Tuttle, R. Papoian and N. Ben-Jonathan (2010). "Unexploited therapies in breast and prostate cancer: blockade of the prolactin receptor." Trends Endocrinol Metab **21**(11): 691-698.
- Jakob, U., M. Gaestel, K. Engel and J. Buchner (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." J Biol Chem **268**(3): 1517-1520.
- Johnston, P. A. (2011). "Redox cycling compounds generate H₂O₂ in HTS buffers containing strong reducing reagents--real hits or promiscuous artifacts?" Curr Opin Chem Biol **15**(1): 174-182.
- Kalia, S. K., L. V. Kalia and P. J. McLean (2010). "Molecular chaperones as rational drug targets for Parkinson's disease therapeutics." CNS Neurol Disord Drug Targets **9**(6): 741-753.

- Kampinga, H. H. and E. A. Craig (2010). "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(8): 579-592.
- Kampinga, H. H., J. Hageman, M. J. Vos, H. Kubota, R. M. Tanguay, E. A. Bruford, M. E. Cheetham, B. Chen and L. E. Hightower (2009). "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins." Cell Stress Chaperon **14**(1): 105-111.
- Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." Eur J Dermatol **12**(4): 390-401.
- Kaufmann, S. H. (1990). "Heat-shock proteins: a missing link in the host-parasite relationship?" Med Microbiol Immunol **179**(2): 61-66.
- Kay, S., S. Hahn, E. Marois, G. Hause and U. Bonas (2007). "A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator." Science **318**(5850): 648-651.
- Kerns, M., D. DePianto, M. Yamamoto and P. A. Coulombe (2010). "Differential modulation of keratin expression by sulforaphane occurs via Nrf2-dependent and -independent pathways in skin epithelia." Mol Biol Cell **21**(23): 4068-4075.
- Kerns, M. L., D. DePianto, A. T. Dinkova-Kostova, P. Talalay and P. A. Coulombe (2007). "Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14460-14465.
- Kim, J. S. and C. O. Pabo (1998). "Getting a handhold on DNA: design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2812-2817.
- Kim, Y. G., J. Cha and S. Chandrasegaran (1996). "Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1156-1160.
- Koebner, H. (1886). "Hereditäre anlage zur blasenbildung." Dtsch Med Wochenschr **12**: 21-22.
- Kubota, K., Y. Niinuma, M. Kaneko, Y. Okuma, M. Sugai, T. Omura, M. Uesugi, T. Uehara, T. Hosoi and Y. Nomura (2006). "Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress." J Neurochem **97**(5): 1259-1268.
- Lee, D., D. Santos, H. Al-Rawi, A. M. McNeill and E. L. Rugg (2008). "The chemical chaperone trimethylamine N-oxide ameliorates the effects of mutant keratins in cultured cells." Br J Dermatol **159**(1): 252-255.
- Lee, K. H. (2000). "Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application." Yonsei Med J **41**(6): 774-779.
- Lepourcelet, M., Y. N. P. Chen, D. S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A. W. Wood and R. A. Shivdasani (2004). "Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex." Cancer Cell **5**(1): 91-102.
- Li, X. L., S. X. Xiao, Z. H. Peng, Y. Liu, M. Pan and S. N. Zhou (2007). "A mutation in exon 1 of keratin 14 resulting in a Chinese family with epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara." J Eur Acad Dermatol Venereol **21**(7): 979-981.
- Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous end-joining pathway." Annu Rev Biochem **79**: 181-211.

- Liovic, M., M. D'Alessandro, M. Tomic-Canic, V. N. Bolshakov, S. E. Coats and E. B. Lane (2009). "Severe keratin 5 and 14 mutations induce down-regulation of junction proteins in keratinocytes." Exp Cell Res **315**(17): 2995-3003.
- Liovic, M., J. Stojan, P. E. Bowden, D. Gibbs, A. Vahlquist, E. B. Lane and R. Komel (2001). "A novel keratin mutation (K5V186L) in a family with EBS-K: a conservative substitution can lead to development of different disease phenotypes." J Invest Dermatol **116**(6): 964-969.
- Liu, X., Q. Jiang, S. G. Mansfield, M. Puttaraju, Y. Zhang, W. Zhou, J. A. Cohn, M. A. Garcia-Blanco, L. G. Mitchell and J. F. Engelhardt (2002). "Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." Nat Biotechnol **20**(1): 47-52.
- Liu, X. L., S. C. Doné, K. Yan, P. Kilpeläinen, T. Pikkarainen and K. Tryggvason (2004). "Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone." J Am Soc Nephrol **15**(7): 1731-1738.
- Loffek, S., S. Woll, J. Hohfeld, R. E. Leube, C. Has, L. Bruckner-Tuderman and T. M. Magin (2010). "The ubiquitin ligase CHIP/STUB1 targets mutant keratins for degradation." Hum Mutat **31**(4): 466-476.
- Lu, H., J. Chen, L. Planko, P. Zigrino, L. Klein-Hitpass and T. M. Magin (2007). "Induction of inflammatory cytokines by a keratin mutation and their repression by a small molecule in a mouse model for EBS." J Invest Dermatol **127**(12): 2781-2789.
- Ma, L., S. Yamada, D. Wirtz and P. A. Coulombe (2001). "A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks." Nat Cell Biol **3**(5): 503-506.
- Maestri, N. E., S. W. Brusilow, D. B. Clissold and S. S. Bassett (1996). "Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency." N Engl J Med **335**(12): 855-859.
- Malkinson, F. D. (1999). "Two familial cases of epidermolysis bullosa simplex successfully treated with tetracycline." Arch Dermatol **135**(8): 997-998.
- Marionnet, C., C. Pierrard, C. Vioux-Chagnoleau, J. Sok, D. Asselineau and F. Bernerd (2006). "Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin." J Invest Dermatol **126**(5): 971-979.
- Marshall, H., M. Venkat, N. S. Seng, J. Cahn and D. H. Juers (2012). "The use of trimethylamine N-oxide as a primary precipitating agent and related methylamine osmolytes as cryoprotective agents for macromolecular crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **68**(Pt 1): 69-81.
- Mayr, L. M. and D. Bojanic (2009). "Novel trends in high-throughput screening." Curr Opin Pharmacol **9**(5): 580-588.
- McLean, W. H. and C. B. Moore (2011). "Keratin disorders: from gene to therapy." Hum Mol Genet **20**(R2): R189-197.
- Michelini, E., L. Cevenini, L. Mezzanotte, A. Coppa and A. Roda (2010). "Cell-based assays: fuelling drug discovery." Anal Bioanal Chem **398**(1): 227-238.
- Miller, J., A. D. McLachlan and A. Klug (1985). "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes." EMBO J **4**(6): 1609-1614.

- Miller, J. C., M. C. Holmes, J. Wang, D. Y. Guschin, Y. L. Lee, I. Rupniewski, C. M. Beausejour, A. J. Waite, N. S. Wang, K. A. Kim, P. D. Gregory, C. O. Pabo and E. J. Rebar (2007). "An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing." Nat Biotechnol **25**(7): 778-785.
- Mitsuhashi, Y. and I. Hashimoto (2003). "Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa." Arch Dermatol Res **295 Suppl 1**: S29-33.
- Moehle, E. A., J. M. Rock, Y. L. Lee, Y. Jouvenot, R. C. DeKolver, P. D. Gregory, F. D. Urnov and M. C. Holmes (2007). "Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3055-3060.
- Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." Histochem Cell Biol **129**(6): 705-733.
- Monneret, C. (2005). "Histone deacetylase inhibitors." Eur J Med Chem **40**(1): 1-13.
- Moore, J. K. and J. E. Haber (1996). "Cell cycle and genetics requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **16**(5): 2164-2173.
- Moore, K. and S. Rees (2001). "Cell-Based Versus Isolated Target Screening: How Lucky Do You Feel?" J Biomol Screen **6**(2): 69-74.
- Morimoto, R. I. and M. G. Santoro (1998). "Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection." Nat Biotechnol **16**(9): 833-838.
- Morley, S. M., S. R. Dundas, J. L. James, T. Gupta, R. A. Brown, C. J. Sexton, H. A. Navsaria, I. M. Leigh and E. B. Lane (1995). "Temperature sensitivity of the keratin cytoskeleton and delayed spreading of keratinocyte lines derived from EBS patients." Journal of Cell Science **108**(11): 3463-3471.
- Moss, C., A. Wong and P. Davies (2009). "The Birmingham Epidermolysis Bullosa Severity score: development and validation." British Journal of Dermatology **160**(5): 1057-1065.
- Moynahan, M. E. and M. Jasin (2010). "Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 196-207.
- Mussolino, C., R. Morbitzer, F. Lütge, N. Dannemann, T. Lahaye and T. Cathomen (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." Nucleic Acids Res **39**(21): 9283-9293.
- Mymrikov, E. V., A. S. Seit-Nebi and N. B. Gusev (2011). "Large potentials of small heat shock proteins." Physiol Rev **91**(4): 1123-1159.
- Neufeld-Kaiser, W. and V. P. Sybert (1997). "Is cyproheptadine effective in the treatment of subjects with epidermolysis bullosa simplex-Dowling-Meara?" Arch Dermatol **133**(2): 251-252.
- Nollen, E. A. and R. I. Morimoto (2002). "Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2809-2816.
- Orphanet. "Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins." Retrieved Septembre, 2013, from <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=FR>.

- Ozcan, U., E. Yilmaz, L. Ozcan, M. Furuhashi, E. Vaillancourt, R. O. Smith, C. Z. Görgün and G. S. Hotamisligil (2006). "Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes." Science **313**(5790): 1137-1140.
- Pabo, C. O., E. Peisach and R. A. Grant (2001). "Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins." Annu Rev Biochem **70**: 313-340.
- Paladini, R. D. and P. A. Coulombe (1999). "The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16." J Cell Biol **146**(5): 1185-1201.
- Paller, A. S. (2004). "In this issue: The complexities of epidermolysis bullosa "simplex"." J Invest Dermatol **122**(1): vi-vii.
- Park, S., J. Gwak, M. Cho, T. Song, J. Won, D. E. Kim, J. G. Shin and S. Oh (2006). "Hexachlorophene inhibits Wnt/beta-catenin pathway by promoting Siah-mediated beta-catenin degradation." Mol Pharmacol **70**(3): 960-966.
- Pelletier, J. C., J. T. t. Lundquist, A. M. Gilbert, N. Alon, F. J. Bex, B. M. Bhat, M. G. Bursavich, V. E. Coleburn, L. A. Felix, D. M. Green, P. Green, D. B. Hauze, Y. P. Kharode, H. S. Lam, S. R. Lockhead, R. L. Magolda, J. J. Matteo, J. F. Mehlmann, C. Milligan, R. J. Murrills, J. Pirrello, S. Selim, M. C. Sharp, R. J. Unwalla, M. D. Vera, J. E. Wrobel, P. Yaworsky and P. V. Bodine (2009). "(1-(4-(Naphthalen-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine: a wingless beta-catenin agonist that increases bone formation rate." J Med Chem **52**(22): 6962-6965.
- Perez, E. E., J. Wang, J. C. Miller, Y. Jouvenot, K. A. Kim, O. Liu, N. Wang, G. Lee, V. V. Bartsevich, Y. L. Lee, D. Y. Guschin, I. Rupniewski, A. J. Waite, C. Carpenito, R. G. Carroll, J. S. Orange, F. D. Urnov, E. J. Rebar, D. Ando, P. D. Gregory, J. L. Riley, M. C. Holmes and C. H. June (2008). "Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases." Nat Biotechnol **26**(7): 808-816.
- Petek, L. M., P. Fleckman and D. G. Miller (2010). "Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex." Mol Ther **18**(9): 1624-1632.
- Peters, B., J. Kirfel, H. Büsow, M. Vidal and T. M. Magin (2001). "Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex." Mol Biol Cell **12**(6): 1775-1789.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). "[Histology of skin and hair follicle]." Med Sci (Paris) **22**(2): 131-137.
- Qi, X., T. Hosoi, Y. Okuma, M. Kaneko and Y. Nomura (2004). "Sodium 4-phenylbutyrate protect against cerebral ischemic injury." Mol Pharmacol **66**(4): 899-908.
- Qu, Y., C. L. Bolen and D. W. Bolen (1998). "Osmolyte-driven contraction of a random coil protein." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9268-9273.
- Quinta, H. R., N. M. Galigniana, A. G. Erleijman, M. Lagadari, G. Piwien-Pilipuk and M. D. Galigniana (2011). "Management of cytoskeleton architecture by molecular chaperones and immunophilins." Cell Signal **23**(12): 1907-1920.
- Ramalho, R. M., P. S. Ribeiro, S. Solà, R. E. Castro, C. J. Steer and C. M. Rodrigues (2004). "Inhibition of the E2F-1/p53/Bax pathway by

- tauroursodeoxycholic acid in amyloid beta-peptide-induced apoptosis of PC12 cells." J Neurochem **90**(3): 567-575.
- Rebar, E. J. and C. O. Pabo (1994). "Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities." Science **263**(5147): 671-673.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: the Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells." Cell **6**(3): 331-344.
- Ritossa, F. A. (1962). "New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*." Experientia **18**(12): 571-573.
- Roberts, G. P. and J. Brunt (1986). "Differentiation-related changes in glycoprotein synthesis by human keratinocytes." Biochem J **237**(2): 519-525.
- Rodrigues, C. M., C. L. Stieers, C. D. Keene, X. Ma, B. T. Kren, W. C. Low and C. J. Steer (2000). "Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition." J Neurochem **75**(6): 2368-2379.
- Rubenstein, R. C. and B. M. Lyons (2001). "Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(1): L43-L51.
- Rubenstein, R. C. and P. L. Zeitlin (2000). "Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of delta F508-CFTR." Am J Physiol Cell Physiol **278**(2): C259-C267.
- Rugg, E. L., H. M. Horn, F. J. Smith, N. J. Wilson, A. J. Hill, G. J. Magee, C. S. Shemanko, D. U. Baty, M. J. Tidman and E. B. Lane (2007). "Epidermolysis bullosa simplex in Scotland caused by a spectrum of keratin mutations." J Invest Dermatol **127**(3): 574-580.
- Russell, D., P. D. Andrews, J. James and E. B. Lane (2004). "Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes." J Cell Sci **117**(22): 5233-5243.
- Ryu, H., K. Smith, S. I. Camelo, I. Carreras, J. Lee, A. H. Iglesias, F. Dangond, K. A. Cormier, M. E. Cudkowicz, R. H. J. Brown and R. J. Ferrante (2005). "Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice." J Neurochem **93**(5): 1087-1098.
- Sakahira, H., P. Breuer, M. K. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2002). "Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **99** Suppl 4: 16412-16418.
- San Filippo, J., P. Sung and H. Klein (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-257.
- Sander, J. D., L. Cade, C. Khayter, D. Reyon, R. D. Peterson, J. K. Joung and J. R. Yeh (2011). "Targeted genome disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 697-698.
- Santoro, M. M., Y. Liu, S. M. Khan, L. X. Hou and D. W. Bolen (1992). "Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes." Biochemistry **31**(23): 5278-5283.
- Sawamura, D., H. Nakano and Y. Matsuzaki (2010). "Overview of epidermolysis bullosa." J Dermatol **37**(3): 214-219.

- Scaglia, F., S. Carter, W. E. O'Brien and B. Lee (2004). "Effect of alternative pathway therapy on branched chained amino acid metabolism in urea cycle disorder patients." Mol Genet Metab **81**(Suppl 1): S79-85.
- Schein, C. H. (1990). "Solubility as a function of protein structure and solvent components." Biotechnol **8**(4): 308-317.
- Shin, K. C., B. Y. Park, H. K. Kim, W. S. Kim and T. H. Bae (2011). "The use of cultured allogenic keratinocyte grafting in a patient with epidermolysis bullosa simplex." Ann Dermatol **23**(Suppl 3): S393-S397.
- Shoichet, B. K. (2006). "Screening in a spirit haunted world." Drug Discov Today **11**(13-14): 607-615.
- Simon, M., N. Jonca, M. Guerrin, M. Haftek, D. Bernard, C. Caubet, T. Egelrud, R. Schmidt and G. Serre (2001). "Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation." J Biol Chem **276**(23): 20292-20299.
- Singer, M. A. and S. Lindquist (1998). "Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo." Mol Cell **1**(5): 639-648.
- Singh, L. R., X. Chen, V. Kozich and W. D. Kruger (2007). "Chemical chaperone rescue of mutant human cystathionine beta-synthase." Mol Genet Metab **91**(4): 335-342.
- Singh, O. V., H. B. Pollard and P. L. Zeitlin (2008). "Chemical rescue of deltaF508-CFTR mimics genetic repair in cystic fibrosis bronchial epithelial cells." Mol Cell Proteomics **7**(6): 1099-1110.
- Slater, K. (2001). "Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery." Curr Opin Biotech **12**(1): 70-74.
- Smith, T. A., P. M. Steinert and D. A. Parry (2004). "Modeling effects of mutations in coiled-coil structures: case study using epidermolysis bullosa simplex mutations in segment 1a of K5/K14 intermediate filaments." Proteins **55**(4): 1043-1052.
- Spira, A. I. and M. A. Carducci (2003). "Differentiation therapy." Curr Opin Pharmacol **3**(4): 338-343.
- Steinert, P. M., J. M. Yang, S. J. Bale and J. G. Compton (1993). "Concurrence between the molecular overlap regions in keratin intermediate filaments and the locations of keratin mutations in genodermatoses." Biochem Biophys Res Commun **197**(2): 840-848.
- Strachan, T. and A. P. Read (1999). Human Molecular Genetics. 2nd edition. New York, Wiley-Liss: 515-545.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.
- Sung, P. and H. Klein (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 739-750.
- Sung, Y. H., I.-J. Baek, J. K. Seong, J.-S. Kim and H.-W. Lee (2012). "Mouse genetics: Catalogue and scissors." BMB Reports **45**(12): 686-692.
- Tachibana, T. (1995). "The Merck cell: recent findings and unresolved problems." Arch Histol Cytol **58**(4): 379-396.
- Takayama, S., Z. Xie and J. C. Reed (1999). "An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators." J Biol Chem **274**(2): 781-786.

- Tamai, K., Y. Kaneda and J. Uitto (2009). "Molecular therapies for heritable blistering diseases." Trends Mol Med **15**(7): 285-292.
- Tamarappoo, B. K. and A. S. Verkman (1998). "Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones." J Clin Invest **101**(10): 2257-2267.
- Tan, S., D. Guschin, A. Davalos, Y. L. Lee, A. W. Snowden, Y. Jouvenot, H. S. Zhang, K. Howes, A. R. McNamara, A. Lai, C. Ullman, L. Reynolds, M. Moore, M. Isalan, L. P. Berg, B. Campos, H. Qi, S. K. Spratt, C. C. Case, C. O. Pabo, J. Campisi and P. D. Gregory (2003). "Zinc-finger protein-targeted gene regulation : genomewide single-gene specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 11997-12002.
- Tang, H. Y., W. D. Du, Y. Cui, X. Fan, C. Quan, Q. Y. Fang, F. S. Zhou, F. M. Yao, J. F. Wang, S. Yang and X. Zhang (2009). "One novel and two recurrent mutations in the keratin 5 gene identified in Chinese patients with epidermolysis bullosa simplex." Clin Exp Dermatol **34**(8): e957-961.
- Tatzelt, J., S. B. Prusiner and W. J. Welch (1996). "Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein." EMBO J **15**(23): 6363-6373.
- Tesson, L., C. Usal, S. Ménoret, E. Leung, B. J. Niles, S. Remy, Y. Santiago, A. I. Vincent, X. Meng, L. Zhang, P. D. Gregory, I. Anegón and G. J. Cost (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 695-696.
- Thorne, N., D. S. Auld and J. Inglese (2010). "Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference." Curr Opin Chem Biol **14**(3): 315-324.
- Uitto, J. (2008). "Epidermolysis bullosa: prospects for cell-based therapies." J Invest Dermatol **128**(9): 2140-2142.
- Uitto, J. and G. Richard (2005). "Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification." Clin Dermatol **23**(1): 33-40.
- Urnov, F. D., J. C. Miller, Y. L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregory and M. C. Holmes (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." Nature **435**(7042): 646-651.
- Vanamee, E. S., S. Santagata and A. K. Aggarwal (2001). "Fok I requires two specific DNA sites for cleavage." J Mol Biol **309**(1): 69-78.
- Varma, H., D. C. Lo and B. R. Stockwell (2008). "High Throughput Screening for Neurodegeneration and Complex Disease Phenotypes." Comb Chem High Throughput Screen **11**(3): 238-248.
- Vos, M. J., J. Hageman, S. Carra and H. H. Kampinga (2008). "Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families." Biochemistry **47**(27): 7001-7011.
- Waki, H., K. W. Park, N. Mitro, L. Pei, R. Damoiseaux, D. C. Wilpitz, K. Reue, E. Saez and P. Tontonoz (2007). "The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPARgamma expression." Cell Metab **5**(5): 357-370.
- Wally, V., M. Brunner, T. Lettner, M. Wagner, U. Koller, A. Trost, E. M. Murauer, S. Hainzl, H. Hintner and J. W. Bauer (2010). "K14 mRNA reprogramming for dominant epidermolysis bullosa simplex." Hum Mol Genet **19**(23): 4715-4725.

- Wally, V., A. Klausegger, U. Koller, H. Lochmuller, S. Krause, G. Wiche, L. G. Mitchell, H. Hintner and J. W. Bauer (2008). "5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene." J Invest Dermatol **128**(3): 568-574.
- Wei, H., S. J. Kim, Z. Zhang, P. C. Tsai, K. E. Wisniewski and A. B. Mukherjee (2008). "ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones." Hum Mol Genet **17**(4): 469-477.
- Welch, W. J. and C. R. Brown (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperon **1**(2): 109-115.
- Werner, N. S., R. Windoffer, P. Strnad, C. Grund, R. E. Leube and T. M. Magin (2004). "Epidermolysis bullosa simplex-type mutations alter the dynamics of the keratin cytoskeleton and reveal a contribution of actin to the transport of keratin subunits." Mol Biol Cell **15**(3): 990-1002.
- Wood, A. J., T. W. Lo, B. Zeitler, C. S. Pickle, E. J. Ralston, A. H. Lee, R. Amora, J. C. Miller, E. Leung, X. Meng, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov and B. J. Meyer (2011). "Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs." Science **333**(6040): 307.
- Yancey, P. H. (2004). "Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead sea to the deep sea." Sci Prog **87**(Pt 1): 1-24.
- Yancey, P. H. (2005). "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses." J Exp Biol **208**(Pt 15): 2819-2830.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero (1982). "Living with water stress: evolution of osmolyte systems." Science **217**(4566): 1214-1222.
- Yancey, P. H., A. L. Fyfe-Johnson, R. H. Kelly, V. P. Walker and M. T. Auñón (2001). "Trimethylamine oxide counteracts effects of hydrostatic pressure on proteins of deep-sea teleosts." J Exp Zool **289**(3): 172-176.
- Yancey, P. H. and G. N. Somero (1979). "Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes." Biochem J **183**(2): 317-323.
- Yang, Y. and C. E. Walsh (2005). "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing." Mol Ther **12**(6): 1006-1012.
- Yasukawa, K., D. Sawamura, M. Goto, H. Nakamura, S. Y. Jung, S. C. Kim and H. Shimizu (2006). "Epidermolysis bullosa simplex in Japanese and Korean patients: genetic studies in 19 cases." Br J Dermatol **155**(2): 313-317.
- Zeitlin, P. L., M. Diener-West, R. C. Rubenstein, M. P. Boyle, C. K. Lee and L. Brass-Ernst (2002). "Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate." Mol Ther **6**(1): 119-126.